

Ядрихинская М. С.<sup>1</sup>, Шахгильдян В.И.<sup>2</sup>, Сафонова А.П.<sup>2</sup>, Шипулина О.Ю.<sup>2</sup>,  
АльваресФигероа М.В.<sup>2</sup>, Долгова Е.А.<sup>2</sup>, Домонова Э.А.<sup>2</sup>, Леонова Т.Е.<sup>1</sup>,  
Перегудова А.Б.<sup>1</sup>, Павлова Л.Е.<sup>1</sup>, Маринченко М.Н.<sup>1</sup>, Тишкевич О. А.<sup>1</sup>

## Значение молекулярных методов в диагностике вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией

1 - Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения г. Москвы, 2 - Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

Yadrikhinskaya M.S., Shakhgildyan V.I., Safonova A.P., Shipulina O.Y., Alvares-Figueroa M.V., Dolgova E.A., Domonova E.A., Leonova T.E., Peregudova A.B., Pavlova L.E., Marinchenko M.N., Tishkevich O.A.

### The role of molecular methods in diagnosis of opportunistic diseases in HIV-infected patients

#### Резюме

С целью определения диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией в 2007-2013 гг. обследовано 4133 стационарных взрослых пациентов (в стадии 4Б (СПИД) - 4В (СПИД) - 76%, количеством CD4-лимфоцитов в крови <200 кл/мкл - 75%). Исследовано 6847 биоматериалов (образцов крови, БАЛЖ, СМЖ и др.) на наличие и количественное определение ДНК *M. tuberculosis*, *Cytomegalovirus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. cruzei*, *C. neoformans*, *T. gondii*, *H. Simplex-I-II*, *HerpesVI*, ВЭБ, JC-вируса, РНК ВИЧ молекулярными методами (ПЦР-тест-системы ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Установлено диагностическое значение качественного и количественного содержания ДНК возбудителей основных оппортунистических заболеваний в биологических жидкостях и тканях; обоснована центральная роль молекулярных методов в своевременной постановке этиологического диагноза вторичных патологий у больных ВИЧ-инфекцией.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, ДНК микобактерий туберкулеза, ДНК ЦМВ

#### Summary

Objective: to assess the diagnostic significance of opportunistic diseases pathogens detection in biological samples from HIV-infected patients. Methods: in 2007-2013, 4133 adult hospital patients were examined (76% had AIDS; CD4 blood count < 200 cells/mcL - 75%). 6847 biological samples (blood samples, BAL, CSF, etc.) were examined for *M. tuberculosis*, Cytomegalovirus, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. cruzei*, *C. neoformans*, *T. gondii*, *H. Simplex I-II*, *HerpesVI*, Epstein-Barr virus (EBV) and JC-virus DNAs, and HIV RNA presence and concentration (PCR-test in Federal Budget Institution of Science "Central Research Institute of Epidemiology" was used). Results: The role of the main opportunistic diseases pathogens DNA presence and concentrations in biological fluids and tissues in diagnosis was established; the central role of molecular methods in prompt diagnosis of opportunistic diseases in HIV-infected people was proven.

**Key words:** HIV-infection, DNA *M. tuberculosis*, DNA CMV

В настоящее время в стране сохраняется рост общего количества ВИЧ-инфицированных лиц, числа больных на стадии СПИДа, больных, нуждающихся в стационарном лечении, увеличивается количество летальных исходов, связанных с ВИЧ-инфекцией [1]. По данным ФНМЦ ПБ СПИД число ВИЧ-инфицированных российских граждан на 01.08.2016 г. составило 1 062 476 [1]. Количество больных на стадии СПИДа 2005 г. насчитывалось 1 600 человек, 2014 г. - 36 119, 2016 г. (октябрь месяц) - 51 207 чел. В 2005 г. в РФ было зарегистрировано 6122

смерти среди больных ВИЧ-инфекцией, в 2014 г. - более 24 416, за 6 месяцев 2016 г. - 12 878 (на 7,5% больше, чем за тот же период 2015 г.). Причем, если в 2005 г. у 12% лиц причиной летального исхода были вторичные заболевания, то в 2014 г. данный показатель составил 22,4%, в 2016 г. (октябрь) - 25,4% [2]. Не менее половины от общего числа госпитализированных в инфекционный стационар г. Москвы больных ВИЧ-инфекцией (2001 г. - 1500 чел., 2015 г. - 6414 чел.) находились на стадии вторичных заболеваний (4Б (СПИД) - 4В (СПИД)). (2010

г. - 51,6%, 2012 г. - 55%, 2014 г. - 51,2%) [2]. Среди 51 207 больных, имевших стадию СПИДа, большинство - 42 422 (82,8%) - погибли. Соответственно, все большее значение приобретает проблема эффективной помощи ВИЧ-инфицированным больным, страдающим вторичными заболеваниями (токсоплазмозом, ЦМВ-инфекцией (ЦМВИ), пневмоцистной пневмонией, туберкулезом, грибковыми поражениями, многоочаговой лейкоэнцефалопатией, лимфомой головного мозга и др.). Учитывая отсутствие патогномичных клинических признаков, частой смешанной этиологией поражения внутренних органов, вопрос ранней диагностики вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией с выраженной иммуносупрессией остается актуальным. Наиболее распространенные методы серологической диагностики (определение специфических АТ различных классов) мало информативны для определения этиологической природы органных поражений. Выявление возбудителя заболевания путем проведения вирусологических и бактериологических методов обладает низкой чувствительностью и требует длительного времени для получения результата. Обнаружение антигенов микроорганизмов уступает по чувствительности методам выявления ДНК возбудителей. Выявление возбудителя вторичных патологий без определения количественной оценки в том или ином биологическом материале не всегда свидетельствует об этиологической роли патогена и может быть не достаточным для установления природы органных патологий.

Продолжается интенсивный поиск оптимальных подходов к предупреждению вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией на фоне глубокой иммуносупрессии, актуальны выработка лабораторных критериев для начала упреждающей терапии с целью предотвращения манифестации оппортунистических инфекций, установление лабораторных критериев эффективности проводимого этиотропного лечения и длительности поддерживающей терапии для профилактики рецидивов оппортунистического заболевания.

Внедрение молекулярных методов, обладающих высокой аналитической чувствительностью, для диагностики оппортунистических инфекционных заболеваний затруднено в связи с не установленным клиническим значением (прежде всего клинической специфичности) получаемых результатов. Не известно диагностическое и прогностическое значение различных концентраций ДНК возбудителей вторичных заболеваний в биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией.

Целью исследования явилось определение диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в различных биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией.

Методы и объем исследования. В 2007 - 2010 гг. проводили клиническое и лабораторное обследование 3000 стационарных взрослых больных ВИЧ-инфекцией на стадии вторичных заболеваний (4А, 4Б, 4В), в 77% случаев имевших стадию 4В (СПИД). Средний возраст составил 32 +7,2 лет. У 80% больных количество CD4-

лимфоцитов в крови составило <200 кл/мкл. Было исследовано 2000 образцов цельной крови, 777 образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ), 777 биоптатов бронхов, 112 образцов плевральной жидкости, 14 образцов мокроты, 102 биоптатов пищевода, желудка, толстой кишки, 155 биоптатов лимфоузлов, 454 образцов ликвора. В общей сложности в 4391 биоматериале.

В 2010-2013 гг. обследовали 1333 стационарных больных, из них на стадии 4В (СПИД) - 75,5%, 4Б (СПИД) - 7%, 4А - 6%, 4А - 6%, 3 - 5,5%. Средний возраст пациентов составил 35 + 5,3 лет. Количество CD4-лимфоцитов в крови < 200кл/мкл было у 70% больных, 200 -350 - 14%, 350-500 - 9%, >500 - 7%. Всего исследовано 1300 образцов цельной крови, 642 образца БАЛЖ, 13 биоптатов бронхов, 375 образцов ликвора, 26 биоптата ЖКТ, 45 биоптатов периферических лимфоузлов, 12 образцов мокроты, 28 плевральной жидкости, 5 биоптатов брюшины, по 1-2 биоптата миндалина, биоптата околушной слюнной железы, пунктатов из «натечника», соскоба из ротоглотки, выпота из брюшной полости, отделяемого из раны, стерильного пунктата, пунктата из пиогенной капсулы. Всего: 2456 биоматериалов.

Полученные биологические материалы исследовали на качественное и количественное определение ДНК *M. tuberculosis*, *Cytomegalovirus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. cruzi*, *C. neoformans*, *T. gondii*, *H. Simplex I-II*, *Herpes VI*, вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), JC-вируса с помощью молекулярных методов с использованием ПЦР-тест-систем производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («АмплиСенс Цитомегаловирус-500/ВКО», «АмплиСенс ЦМВ-титр FRT», «АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр-FRT»).

Клиническое значение (диагностические чувствительность и специфичность) лабораторного маркера в биологическом материале определяли с использованием таблиц сопряженности (2 x 2). Согласно полученным результатам, обследуемые больные были распределены в одну из четырех возможных групп в зависимости от отрицательного или положительного значения лабораторного признака, а также наличия или отсутствия заболевания. Соответственно, по каждому лабораторному параметру были составлены следующие группы:

- с «истинно-положительным» (ИП) в отношении диагноза оппортунистического заболевания значением лабораторного маркера, когда у больного присутствовал лабораторный признак и было клинически выраженное заболевание;

- с «ложноположительным» значением (ЛП), когда определяли лабораторный маркер, но заболевание отсутствовало;

- с «истинно-отрицательным» значением (ИО), когда отсутствовали и лабораторный маркер, и заболевание;

- с «ложноотрицательным» значением (ЛО), когда не выявляли лабораторный маркер, но было клинически выраженное заболевание.

Клиническую чувствительность лабораторного признака определяли согласно формуле: ИП/(ИП+ЛО) x 100%; клиническую специфичность - по формуле: ИО/

(ИО +ЛП) x 100%.

Пациенты получали этиотропную терапию вторичных заболеваний.

Результаты и обсуждение. Спектр и частота вторичных заболеваний у 666 больных на стадии 4В (СПИД) в 2013 г. был следующим: туберкулез 269 случаев (40,4%), кандидоз пищевода/бронхов, легких 186/13 (28%/2%), манифестная ЦМВИ 87 (13,1%), токсоплазмоз 55 (8,3%), пневмоцистная пневмония 63 (9,5%), саркома Капоши 6 (0,9%), ВИЧ-энцефалит 9 (1,4%), криптококковый менингит 7 (1%), атипичный микобактериоз 3 (0,5%), криптоспоридиоз кишечника 3 (0,5%), мультифокальная лейкоэнцефалопатия 3 (0,5%), ВПГ-бронхит, энцефалит 3 (0,5%), лимфомомозга первичная/лимфома Беркита 1/6 (0,2/0,9%), пневмонии возвратные 48 (7,2%), генерализованный сальмонеллез 2 (0,3%), рак шейки матки 4 (0,6%) случаев.

Этиология вторичных заболеваний у 468 умерших больных ВИЧ-инфекцией в Москве в 2013 г. была сходной (по данным п/а отделения ИКБ №2): туберкулез 194 случаев (41,5%), ЦМВИ 58 (12,4%), пневмоцистная пневмония 54 (11,5%), пневмонии возвратные 44 (9,4%), токсоплазмоз 36 (7,7%), лимфомы 31 (6,6%), п/острый ВИЧ-энцефалит 12 (2,6%), криптококковый менингит 21 (4,5%), атипичный микобактериоз 16 (3,4%), генерализованные микозы 7 (1,5%), многоочаговая лейкоэнцефалопатия 6 (1,3%), саркома Капоши 4 (0,8%), герпетический энцефалит 1 (0,2%), рак шейки матки 1 (0,2%), астроцитомы мозга 1 (0,2%). Также имели место циррозы печени у 60 больных (12,8%), сепсис, бактериальный эндокардит 28 (5,3%).

В предыдущих исследованиях при изучении значения выявления ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови для диагностики манифестной ЦМВИ у больных ВИЧ-инфекцией нами была установлена низкое клиническое значение качественного обнаружения ДНК ЦМВ в крови больных в связи с низкой клинической специфичностью (65,5%) (при 100% чувствительности) [3]. С целью оценки диагностического значения различных концентраций ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови ВИЧ-серопозитивных больных было обследовано 1698 пациентов, из которых у 293 (17,3%) в образцах крови была выявлена ДНК ЦМВ в количестве: <1.0 lg ДНК ЦМВ в 8,5% случаев, 1.0 – 1.9 lg ДНК ЦМВ - 41.1%, 2.0 – 2.9 lg ДНК ЦМВ - 26.4%, 3.0 – 3.9 lg ДНК ЦМВ - 17.8%, 4.0 – 4.9 lg ДНК ЦМВ - 5.4%, 5.0 и более lg ДНК ЦМВ - 0.8% случаев. Манифестная ЦМВИ диагностирована у 96 больных (наличие ретинита, ДНК ЦМВ и цитомегалоклеток в биоптате или аутопте пораженного органа) при наличии ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови в количестве: <2.0 lg ДНК ЦМВ – 1%, 2 – 2.9 lg ДНК ЦМВ – 50%, 3 – 3.9 lg ДНК ЦМВ – 91.3%, 4 и более lg ДНК ЦМВ – 100%. Диагностическое значение было максимальным у показателя 3.0 lg ДНК ЦМВ и более в 105 лейкоцитах (клиническая чувствительность 72,9%, специфичность 99,7%) [3].

На наличие ДНК ЦМВ в плазме исследовано 135 образцов. Минимальная концентрация ДНК ЦМВ составила 100 коп/мл, максимальная 10 000 000 коп/мл (100-

1000 коп/мл – 33%, 1000-10000 - 10,4%, >10000 - 3,7% случаев). Предварительные результаты показали корреляцию между количеством ДНК вируса в клетках и частотой выявления ДНК ЦМВ в плазме крови, но при наличии активной ЦМВИ ДНК ЦМВ в плазме определяли позднее по сравнению с лейкоцитами крови, у больных манифестной ЦМВИ показатели плазменной вирусной нагрузки находились в широких пределах. Наличие высокой концентрации ДНК ЦМВ в плазме крови (более 10 000 коп/мл), по-видимому, подтверждает ЦМВ-природу органических поражений.

Исследование биологических материалов у больных ВИЧ-инфекцией показало наличие ДНК ЦМВ в образцах БАЛЖ в 39.2% случаях, биоптатах бронхов - 14.2%, образцах плевральной жидкости 2.7%, образцах мокроты - 14.3%, биоптатах пищевода, желудка, толстой кишки - 27.4%, биоптатах лимфоузлов - 7.7%, образцах ликвора - 2.6%. Соответственно, стояла задача определения клинического значения присутствия ДНК ЦМВ в том или ином биологическом материале. Были проанализированы результаты исследования БАЛЖ и биоптатов бронхов, полученных при проведении фибробронхоскопии у 744 больных ВИЧ-инфекцией (в 75% случаев количество CD4-лимфоциты <200 кл/мкл) [4]. ДНК ЦМВ была выявлена в БАЛЖ в 294 случаях (39.5%), биоптатах бронхов – 112 (15.1%). ЦМВ-пневмонией страдало 70 человек. Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в БАЛЖ составила 90%, специфичность – лишь 66%, что позволило сделать вывод о низком клиническом значении качественного выявления ДНК вируса в БАЛЖ и необходимость определения концентрации возбудителя в лаважной жидкости [4]. Дальнейшее исследование 642 образцов БАЛЖ показали высокую частоту выявления ДНК ЦМВ (74%) и значительный диапазон количества ДНК возбудителя от 100 до 79 900 700 коп/мл. В 61% случаев количество ДНК ЦМВ было <1000 коп/мл, 20% 1000-10000 коп/мл, в 12% 10000-100000 коп/мл, в 7% случаев >100000 коп/мл.

Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптате бронха составила 79%, специфичность 92%, что позволило считать наличие ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов важным диагностическим критерием ЦМВ-поражения легких. Количественное содержание ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов составляло от 169 до 90972 копий (69,2% случаев 100-1000, 15,3% >1000 копий).

ДНК ЦМВ определяли в различных биоматериалах в разном количественном содержании. В мокроте концентрация ДНК ЦМВ составляла от 100 до 1314600 коп/мл (64% случаев <1000 коп/мл, 18% 1000-10000 коп/мл, 9% 10000-100000 коп/мл, 9% >100000 коп/мл). В плевральной жидкости содержание ДНК ЦМВ находилось в пределах 100-17 900 коп/мл (в 21% случаев 100-1000 коп/мл, 14% 1000-10000 коп/мл, 7% >10000 коп/мл). В лимфоузлах ДНК ЦМВ содержалась в пределах 264-120046 коп. (50% случаев 100-1000 коп, 25% 1000-10000 коп., 12,5% 10000-100000 коп. и 12,5% >100000 коп.). В биоптатах кишечника ДНК ЦМВ обнаруживали в количестве 99 - 444834 коп. (в 23% случаев <1000 коп, 7,7%

1000-10000 коп., 23% 10000-100000 коп., 11,5% >100000 коп.). В дальнейшей работе необходимо будет определить клиническое значение количественного содержания ДНК ЦМВ в указанных биологических материалах.

Предварительные результаты исследований показывают, что факт обнаружения ДНК ЦМВ в ликворе не является достаточным основанием для постановки диагноза ЦМВ-энцефалита. Количественное содержание ДНК ЦМВ в СМЖ было в пределах от 100 до 850 600 коп/мл. В 8,8% случаев <1000 коп/мл, 2% 1000-10000 коп/мл, 0,8% 10000-100000 коп/мл, 0,26% >100000 коп/мл. У больных, страдающих ЦМВ-энцефалитом (диагноз ставился на основании посмертных исследований и/или на основании характерных нейрокогнитивных проявлений (в ряде случаев в сочетании с ретинитом), данных МРТ, высокой концентрации ДНК ЦМВ в крови, отсутствии ДНК JC-вируса и низкой концентрации РНК ВИЧ в ликворе), содержание ДНК ЦМВ было не ниже 20 000 коп/мл. По-видимому, у больных ВИЧ-инфекцией, страдающих энцефалитом, наличие ДНК ЦМВ в спинномозговой жидкости в концентрации >10 000 коп/мл указывает на цитомегаловирусную природу поражения головного мозга, но требуется проведение дальнейших исследований для уточнения диагностического значения различных концентраций ДНК ЦМВ в ликворе.

Следовательно, на ЦМВ-природу поражения органов указывает факт обнаружения ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови в количестве не менее 2,0 Ig ДНК вируса, в плазме крови – в количестве не менее 10 000 коп/мл, а также наличие цитомегалоклеток в биопсийном материале пораженного органа. Определение диагностического значения количественного содержания ДНК ЦМВ в БАЛЖ, ликворе, биоптатах органов, в других биологических материалах требует дальнейшего анализа.

Проведенное исследование по определению значения различных специфических лабораторных признаков активной репликации ЦМВ у беременных ВИЧ-инфицированных женщин в качестве прогностических маркеров врожденной и внутриутробной ЦМВИ (130 беременных женщин и 128 рожденных ими детей) показало, что риск трансплацентарного заражения плода ЦМВ составил лишь 3,4%, если мать не имела в крови ДНК вируса, напротив, риск антенатального инфицирования плода при наличии ДНК ЦМВ в цельной крови у матери составил 60%, а с учетом интранатального пути заражения – 80% [5]. Следовательно, наличие ДНК ЦМВ в крови ВИЧ-инфицированной беременной женщины является достоверным признаком активной репликации ЦМВ и служит важным маркером высокого риска антенатального и интранатального заражения данным вирусом ребенка.

Исследование крови на наличие ДНК ЦМВ у пациентов с ЦМВ-инфекцией, получающих этиотропную терапию ганцикловиром, продемонстрировало роль данного маркера, как критерия эффективности проводимого лечения. На фоне этиотропной терапии в 98% случаев отмечали снижения концентрации ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови до неопределяемого уровня.

Обнаружение ДНК ЦМВ в крови является критерием активности инфекционного процесса и имеет прогностическое значение в развитии манифестной ЦМВИ. В зависимости от наличия и количественного содержания ДНК ЦМВ в крови больных ВИЧ-инфекцией частота развития манифестной ЦМВИ в течение года была различна. Клинически выраженная ЦМВИ имела место в 0,8% случаев при первоначальном отсутствии ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови, в 18,2% - при минимальной концентрации ДНК ЦМВ, 31,2% - низкой, 50% - средней, 92,9% - высокой. На основании полученных данных была дана рекомендация о начале упреждающей терапии валганцикловиром (900 мг/сут) у больных ВИЧ-инфекцией при количестве в крови CD4-лимфоцитов <50-100 кл/мкл и наличии ДНК ЦМВ в цельной крови в концентрации 2,0 Ig ген/мл или наличии ДНК ЦМВ в плазме с целью профилактики развития манифестных форм ЦМВИ. Терапию проводили под контролем ДНК ЦМВ в крови (1 раз в 2-4 недели) и осмотра офтальмолога (1 раз в мес.), длительность ее составляла не менее одного месяца. В результате проведения превентивной терапии у 120 больных ВИЧ-инфекцией с глубокой иммуносупрессией частота клинически выраженной ЦМВИ снизилась с 30% до 7,5% (время наблюдения 2,5 года) [3]. Результатом внедрения современных методов диагностики ЦМВ-инфекции, проведения на их основе превентивной и лечебной этиотропной терапии, а также своевременного начала АРВТ стало сокращение доли ВИЧ-инфицированных больных, погибших от клинически выраженной ЦМВИ с 41,2% в 2001 г. до 13,8% в 2015 г.

Обнаружение в содержимом везикул ДНК ВПГ или ДНК ВВЗ имеет важное значение при дифференциальной диагностике атипичного поражения кожи. При обследовании 68 ВИЧ-инфицированных больных, страдающих распространенным поражением кожи лица, вызванных ВПГ (37 человек) и опоясывающим лишаем (31 человек), наличие ДНК ВПГ-1,2 или ВВЗ в содержимом везикулы было выявлено в 88,2%, при этом в крови ДНК возбудителей удалось выявить лишь в 3 случаях (4,4%) (1 сл. - ВПГ-1,2 и 2 сл. - ВВЗ) [6]. Исследование ликвора, которое проводили в связи с наличием поражения ЦНС, показал наличие ДНК ВПГ-1,2 в 3% случаев, ДНК ВВЗ – 1,3%, ДНК ВГЧ-6 – в 1,3% случаев (в концентрациях от 400 до 24100 коп/мл). В группах больных с поражением соответствующих органов, частота выявления в мокроте ДНК ВПГ-1,2 составила 33%, ДНК ВГЧ-6 в мокроте - в 17%, в БАЛЖ – 6,2% (в средней концентрации 147 коп/мл), в плевральной жидкости – 7,1% случаев, в биоптатах лимфоузлов ДНК ВПГ-1,2 выявлена в 2,2%, ДНК ВГЧ-6 - 2,2% случаев, в биоптатах ЖКТ ДНК ВПГ-1,2 – 3,8%, ДНК ВГЧ-6 – 3,8%. ДНК ВВЗ не была обнаружена ни в одном случае. Значение качественного и количественного выявления ДНК ВПГ-1,2, ВВЗ, ВГЧ-6, ВГЧ-7 в различных биоматериалах для диагностики висцеральных форм герпесвирусных инфекций требует дальнейших исследований.

Согласно полученным данным, ВЭБ является возбудителем, наиболее часто обнаруживаемом в любом

биологическом материале: в крови - в 25,6% случаев, мокроте 67%, БАЛДЖ 44,5%, биоптатах бронхов 15,3%, плевральной жидкости 50%, ликворе 28,5%, биоптатах лимфоузлов 64%, кишечника 19,2% случаев. Количественное содержание ДНК ВЭБ было различным: в крови от 1,0 до 3,3 lg, мокроте от 2400 до 49380000 коп/мл (50% сл. <10000 коп/мл, 12,5% 10000-00000 коп/мл, 37,5% >100000 коп/мл); в БАЛДЖ от 100 до 26385100 коп/мл (38% сл. 100-5000 коп/мл, 31% 5000-50000 коп/мл, 8,5% 50000-100000 коп/мл, 22,5% >100000 коп/мл); в плевральной жидкости от 400 до 1484500 коп/мл (14% сл. <1000 коп/мл, 21% 1000-10000 коп/мл, 3,5% 10000-100000 коп/мл, 11,5% сл. >100000 коп/мл), биоптатах лимфоузлов от 100 до 1553247 коп. (21% сл. <1000 коп, 38% 1000-10000 коп, 38% 10000-100000, 7% >100000), в биоптатах ЖКТ от 100 до 19100 коп, СМДЖ от 100 до 1636500 коп/мл (83% сл. <1000 коп/мл, 11% 1000-10000 коп/мл, 4% 10000 - 100000 коп/мл, 2% >100000 коп/мл). У пациентов с лимфомой головного мозга концентрация ДНК ВЭБ в СМДЖ составила: <1000 коп/мл - 20% пациентов, 1000-10000 коп/мл - 47%, 10 000-100 000 коп/мл - 20%, >100 000 коп/мл - 13%. Представленные данные предполагают значительно более широкий, чем представлялось ранее, спектр органичных поражений, обусловленных ВЭБ. Но диагностическое значение различных концентраций ДНК ВЭБ остается не известным. О первичной лимфоме головного мозга с наибольшей достоверностью свидетельствует концентрация ДНК ВЭБ в ликворе более 10 000 коп/мл.

Важное значение для подтверждения наличия саркомы Капоши имеет обнаружение в местах кожного поражения генома ВГЧ-8 типа. Ранее нами было показано достоверно более частое обнаружение ДНК ВГЧ-8 в биоптатах саркомы Капоши по сравнению с биоптатами непораженной кожи той же части тела больного ВИЧ-инфекции, а также наличие «половых цепочек» между большими ВИЧ-инфекцией с саркомой Капоши [7, 8].

Проведенные нами исследования впервые в РФ показали высокую диагностическую роль выявления ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) у больных ВИЧ-инфекцией [4]. Была проведена диагностическая фибробронхоскопия у 744 больных ВИЧ-инфекцией с исследованием БАЛДЖ и биоптатов бронхов на наличие ДНК МБТ. Больные туберкулезом легких (255 человека) в 181 (71%) случае имели ДНК МБТ в БАЛДЖ, в 156 (61,2%) – биоптатах бронхов. Среди 237 пациентов с наличием ДНК МБТ в БАЛДЖ туберкулез легких был диагностирован у 187 (76,4%) человека, среди 166 пациентов с ДНК МБТ в биоптатах бронхов – у 156 (94%) человек. У остальных пациентов на момент обследования диагноз туберкулеза поставлен не был. Диагностическая чувствительность наличия ДНК МБТ в БАЛДЖ составила 71%, специфичность – 88,5%. Диагностическая чувствительность наличия ДНК МБТ в биоптатах бронхов была на уровне 61,2%, специфичность – 98%. Из 139 ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием ДНК МКБ как в БАЛДЖ, так и в биоптате бронха, не страдали туберкулезом легких только 3 человека (2,2%). Туберкулез легких

был диагностирован лишь у 14,1% больных, не имевших ДНК МКБ ни в БАЛДЖ, ни в биоптатах бронхов [4].

В выполненной работе с использованием «АмплиСенс® МТС-FL» был исследован 71 образец различных видов прижизненно взятого материала (мокроты, БАЛ, плевральной жидкости, ликвора, гноя, мочи, нативных тканевых образцов, материала из парафиновых гистологических блоков) от 42 больных ВИЧ-инфекцией в стадии вторичных заболеваний, впоследствии умерших. К основной группе было отнесено 16 человек, умерших от ТБ (29 образцов), что подтверждено прижизненно методом посева и/или гистобактериоскопически (при патологоанатомическом исследовании). Контрольную группу составили 26 пациентов (42 образца), обследованных прижизненно на наличие ТБ в ПТД, у которых диагнозы ТБ не был подтвержден, и причиной смерти явились иные вторичные заболевания. ДНК МТБ была обнаружена в материалах всех пациентов (100%). Таким образом, диагностическая чувствительность исследованного набора реагентов составила 100%. При исследовании образцов, полученных от больных контрольной группы, ДНК МТС обнаружена не была. Следовательно, диагностическая специфичность набора реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» составила 100%.

Недавнее совместное исследование 304 больных ВИЧ-инфекцией, госпитализированных в ИКБ№ 2 г. Москвы и переведенных впоследствии с диагнозом «туберкулез» в Туберкулезные клинические больницы №3 и № 7 г. Москвы, у 235 из которых был подтвержден диагноз туберкулеза, продемонстрировало высокую чувствительность обнаружения ДНК МБТ мокроте (44,8%), БАЛДЖ (58,3%), биоптатах бронхов (56%) у больных туберкулезом легких и внутригрудных лимфоузлов (ВГЛУ), плевральной жидкости (68,6%), ликворе (54%), биоптатах периферических лимфоузлов (93,7%) при соответствующем туберкулезном поражении [10]. Показатели чувствительности метода ПЦР при выявлении ДНК МБТ у больных туберкулезом на поздних стадиях ВИЧ-инфекции (количество CD4-лимфоцитов в крови составляло от 0 до 235 кл/мкл; медиана – 103 кл/мкл) значительно превышали чувствительность микроскопии, люминисцентной микроскопии и культурального метода. Специфичность наличия ДНК МБТ в биологических материалах составила 100%. Для выявления МБТ использовали набор реагентов для обнаружения ДНК МБТ («АмплиСенс® МТС-FL», ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Амплификацию с гибридационно-флуоресцентной детекцией проводили с помощью прибора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). Результаты были интерпретированы с помощью программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис») [10]. Применение метода ПЦР и выявление ДНК МБТ у больных ВИЧ-инфекцией с глубокой иммуносупрессией увеличивало частоту верификации заболевания, значительно сокращало срок пребывания больных туберкулезом в инфекционном стационаре перед переводом в специализированную больницу, уменьшало время постановки диагноза в туберкулезном стационаре и срок до начала специфической терапии. Особенно акту-

альным является применение ПЦР для анализа биологических материалов при развитии генерализованного ТБ (19% случаев) или микобактериального поражения ЦНС (22,7% больных с патологией ЦНС) [10].

При обследовании 458 больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС 156 пациентов страдали церебральным токсоплазмозом, диагноз которого был основан на клинической картине болезни, данных МРТ головного мозга, отчетливой положительной динамикой по клиническому состоянию и результатам МРТ на фоне этиотропной терапии. ДНК токсоплазмы в ликворе была выявлена у 67 больных (14,6%). Все они имели токсоплазменное поражение головного мозга. Не было ни одного случая обнаружения ДНК возбудителя в СМЖ при отсутствии церебрального токсоплазмоза. Частота обнаружения ДНК *T.gondii* в ликворе среди больных токсоплазмозом составила 42,9%. Соответственно, диагностическая чувствительность наличия ДНК *T.gondii* в ликворе была равна 43% при 100% специфичности, что говорит о необходимости включения в алгоритм обследования больных с поражением ЦНС исследования ликвора на наличие ДНК *T.gondii* [11]. У ряда больных токсоплазмозом удавалось выявить возбудитель в крови и БАЛЖ.

Среди больных ВИЧ-инфекцией с поражением легких частота встречаемости ДНК *P. jiraveci* (*carinii*) (PCP) – возбудителя пневмоцистоза в мокроте составила 17%, БАЛЖ 11%, биоптатах лимфоузлов 6,6% случаев. Для определения клинического значения обнаружения ДНК *P. jirovecii* в БАЛЖ и биоптатах бронхов было ретропективно протестировано 483 образца (290 БАЛЖ, 193 биоптатах бронхов), полученных при проведении диагностической бронхоскопии 360 больных ВИЧ-инфекцией и 63 пробы БАЛЖ, полученных от больных туберкулезом. Из 360 пациентов ДНК PCP была выявлена у 42 (11,7%). Клинические диагнозы до получения результатов лабораторного исследования были следующими: пневмоцистная пневмония (14 больных; 34%), пневмония неясной этиологии (7; 17%), ТБ ВГЛУ в сочетании с пневмонией неясной этиологии (12; 29%), ЦМВ-пневмония (8; 20%; в 4 случаях в сочетании с пневмоцистной пневмонией и ТБ ВГЛУ). ДНК PCP отсутствовала в биоматериалах 318 пациентов (88,3%). Ни в одном из этих случаев диагноз пневмоцистной пневмонии поставлен не был, и ни в одной из 63 проб БАЛЖ больных туберкулезом не была обнаружена ДНК PCP. Приведенные данные свидетельствуют о высоком значении отрицательного результата – отсутствия ДНК PCP в БАЛЖ или биоптатах бронхов – для исключения пневмоцистоза как причины поражения легких, но положительный результат – обнаружение ДНК PCP в БАЛЖ больных ВИЧ-инфекцией – не может служить достаточным основанием для постановки диагноза пневмоцистной пневмонии.

Согласно данным недавних зарубежных работ, обнаружение ДНК JC-вируса в СМЖ при поражении ЦНС является важным диагностическим критерием наличия прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (клиническая чувствительность 72-100%, специфичность 92-100%) [12]. Первые результаты собственных ис-

следований (обнаружение JC-вируса в СМЖ 11 больных) показывают, что до получения результатов обследования в 7 случаях пациентам ставили диагноз «мультифокальная лейкоэнцефалопатия» и в 4 случаях «многоочаговое поражение головного мозга неуточненной этиологии».

При обследовании больных ВИЧ-инфекцией, имеющих поражение дыхательной системы, частота обнаружения в мокроте *S.albicans* составила 8%, *S. glabrata* – 8%, *S. krusei* – 0%, биоптатах бронхов 0%, плевральной жидкости 0%, 3,6%, 0%, соответственно. В БАЛЖ *S. albicans* была выявлена в 20,2% случаев (в количестве от 5 до 4360818 коп/мл); 95%: <1000 коп/мл, 3%: 1000-10000 коп/мл; 2% - >10.000 коп/мл; *S. glabrata* – в 10% случаев (в концентрациях от 5 до 552846 коп/мл (96%: <1000 коп/мл, 3%: 1000-10000коп/мл, 1% >10000 коп/мл); *S. krusei* 2,3%, (в количестве от 5 до 6938 коп/мл) (99%:<1000 коп/мл, 1%: >1000 коп/мл).

Грибы рода *Candida* были также выявлены в лимфоузлах: *S. albicans* в 15,5% случаях (9 – 15953 коп), *S. glabrata* 6,6%, *S. krusei* 4,4%, в биоптатах ЖКТ – 15,3%, 11,5%, 3,8%, ликворе 0,8%, 1%, 0%, соответственно.

Частота обнаружения *Cryptosoccus neoformans* у больных с поражением ЦНС (энцефалит, менингит) была 4,2% (от 255 до 1180400 коп/мл), в том числе: 1% сл. <1000 коп/мл, 1,3% 1000-10000 коп/мл, 0,5% 10000-100000 коп/мл, 1,3% >100000 коп/мл. Выявление ДНК *C. neoformans* в ликворе, БАЛЖ с количественной оценкой содержания возбудителя играло важную роль в постановке диагноза криптококкоза и в оценке эффективности проводимой этиотропной терапии.

Следовательно, использование молекулярных методов для выявления возбудителей оппортунистических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией играет центральную роль в своевременной и точной постановке диагноза у больных ВИЧ-инфекцией, имеющих вторичную патологию. ■

*Шахгильдян Василий Иосифович* – канд. мед. наук, старший научный сотрудник специализированного отд. профилактики и борьбы со СПИДом ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва; *Ядринская Марина Сергеевна* – врач-ординатор Инфекционной клинической больницы №2 Департамента здравоохранения города Москвы; *Сафонова Анна Петровна* – науч. сотр. Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; *Шипулина Ольга Юрьевна* – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., руководитель подразделения молекулярных методов диагностики Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; *Альварес Фигероа Мария Викторовна* – канд. мед. наук, руководитель науч. группы разработки новых методов диагностики туберкулеза отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; *Долгова Екатерина Алексеевна* – мл. науч. сотр. науч. группы разработки новых методов диагностики туберкулеза отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии

Роспотребнадзора, Москва; Дамонова Эльвира Александровна – науч. сотр. Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва; Леонова Татьяна Евгеньевна, канд мед наук, врач-ординатор Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента здравоохранения города Москвы; Перегудова Алла Борисовна канд мед наук, врач-ординатор Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента здравоохранения города Москвы; Павлова Людмила Евгеньевна канд мед наук, врач-ординатор Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента

здравоохранения города Москвы; Маринченко Марина Николаевна канд мед наук, заведующая отделением Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента здравоохранения города Москвы; Тишкевич Олег Александрович – врач-патологоанатом Инфекционной клинической больницы № 2 Департамента здравоохранения города Москвы; Автор, ответственный за перепечатку – Шахгильдян Василий Иосифович, 111123, Москва, ул. Новозиреевская, д. 3а, Телефон: +7(495) 366-05-18, +7 916 678 10 38, E-mail: vishakh@yandex.ru

## Литература:

1. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Тушина О.И., Буравцова Е.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень 2015; 40. 56 с.
2. Ядрихинская М. С., Шахгильдян В.И., Сафонова А.П., Шипулина О.Ю. Структура вторичных заболеваний и современные подходы к их лабораторной диагностики Эпидем. и инф. бол. Акт. вопр. 2015.- №1.- С. 24-30.
3. Шахгильдян В.И. Герпесвирусные инфекции. В кн.: В.В. Покровский ред. ВИЧ-инфекция и СПИД. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 202–236.
4. Шахгильдян В.И., Литвинова Н.Г., Морозова С.В., Шипулина О.Ю. и др. Клиническое значение обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза, цитомегаловируса, токсоплазмы в бронхоальвеолярном лаваже и биоптатах бронхов у ВИЧ-инфицированных больных с легочной патологией Эпидем. и инф. бол., 2006.- №6.- С. 50-54.
5. Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., Сильц В.В., Шамигурина М.К. и др. Диагностика цитомегаловирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных беременных женщин и определение факторов риска антенатального и интранатального заражения плода цитомегаловирусом Акуш. и гинекол., 2005.- №2.- С. 24-29.
6. Хашиева Ф.Н., Потеекаев Н.Н., Кравченко А.В., Шахгильдян В.И., Зудин А.Б. Клиника простого и опоясывающего герпеса у больных ВИЧ-инфекцией. Клиническая дерматология и венерология 2004; 4: 8–10.
7. Панкова Г.Ю., Кравченко А.В., Шахгильдян В.И., Груздев Б.М. Клинические проявления СПИДа у половых партнеров 4-я Междунар. конференц. "СПИД, рак и родственные проблемы, С.-Петербург, 1996.- С.146-147.
8. Галецкий С.А., Козырев Ю.П., Шахгильдян В.И. и др. Скрининг больных саркомой Капоши и некоторыми другими заболеваниями на присутствие последовательностей вируса герпеса 8-го типа (HHV-8/KSHV) Русский журнал ВИЧ/ СПИД и родственные проблемы, 1997.- Т.1,№1.- С.129.
9. Галецкий С.А., Малочков А.В., Кадырова Е.Л., Шахгильдян В.И. ПЦР-диагностика последовательностей нового герпесвируса 8-го типа у больных саркомой Капоши в России Вопросы вирусологии 2000.- Т. 45. №4.- С.13-18
10. Долгова Е.А., Альварес Фигероа М.В., Шахгильдян В.И., Флигель Д.М., Шипулин Г.А. Применение полимеразной цепной реакции для ранней диагностики туберкулеза у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции инфекционного стационара. Эпидем. и инф. бол. 2014.- Т.12, №4.- С.11-17.
11. Перегудова А.Б., Ермак Т.Н., Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., Гончаров Д.Б. Церебральный токсоплазмоз в структуре поражения центральной нервной системы у больных ВИЧ-инфекцией Эпид. и инф. белезни. Акт.вопр. 2013; 1: 26–30.
12. Бартлетт Дж., Галант Дж., Фам П. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции, 2012. М.: Р Валент, 2012. 528 с.