

И.Н. Носова¹, Т.В. Горячева²**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ВЫЯВЛЕНИЯ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ЦНС У ПАЦИЕНТОВ
С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ**¹ООО «Новая диагностика плюс»²Республиканский центр по профилактике и борьбы со СПИДом, г. Донецк

Резюме. Оппортунистические инфекции являются маркерами иммунологического неблагополучия, развивающегося у ВИЧ-инфицированных вследствие прогрессивного течения заболевания. Клиническая диагностика оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных больных затруднена. Широкий диапазон клинических проявлений определяет специфику диагностики этой группы инфекций, выдвигая на первый план лабораторные методы. В работе было предложено использование метода полимеразной цепной реакции для дифференциальной диагностики и прогноза течения болезни при оппортунистических инфекциях центральной нервной системы в спинномозговой жидкости и цельной крови. Ретроспективный анализ лабораторных исследований позволил провести этиологическую диагностику оппортунистических инфекций в короткие сроки, в целях оптимизации лечения с учетом клинических особенностей их течения.

ВИЧ-инфекция — инфекционное заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека, характеризующееся многолетним течением, клинически связанным с прогрессирующим снижением иммунитета, приводящим на последней стадии заболевания к синдрому приобретенного иммунодефицита (СПИД), для которого характерно развитие тяжелых форм оппортунистических заболеваний [1, 2].

У больных с ВИЧ-инфекцией выделяют две основные группы нарушений функций центральной нервной системы (ЦНС): вторичные к ВИЧ-инфекции (например, оппортунистические инфекции (ОИ) головного мозга, злокачественные новообразования ЦНС или цереброваскулярные нарушения) и первичные (обусловленные непосредственным действием ВИЧ на клетки головного мозга). С момента появления антиретровирусной терапии случаев поражения ЦНС оппортунистическими инфекциями стало меньше. Однако спектр этих нарушений не изменился. Из возбудителей ОИ поражение ЦНС у больных с ВИЧ-инфекцией наиболее часто вызывает цитомегаловирус (ЦМВ) [7, 9], при этом могут развиваться подострый или хронический энцефалит, или энцефалит, острый восходящий радикуломиелит, а также острый или подострый неврит. Вирус простого герпеса и вирус ветряной оспы также способны вызывать острый или подострый энцефалит [8, 10]. Наиболее часто менингеальные инфекции обусловлены *Candida sp*, *Mycobacterium tuberculosis* [3]. Токсоплазмозный менингоэнцефалит — наиболее частая причина развития объемных образований головного мозга. Несмотря на разнообразие возбудителей

ОИ, клинические проявления не имеют специфических признаков для каждого конкретного возбудителя, поэтому особенное значение для диагностики приобретают лабораторные методы. Биологическим материалом, рекомендуемым для выявления большинства возбудителей, является спинномозговая жидкость (СМЖ). Традиционные методы диагностики, такие как микроскопия и бактериология, обладают высокой специфичностью, но низкой чувствительностью. Связано это с ограниченным количеством возбудителя в СМЖ. ПЦР — диагностика СМЖ имеет существенные преимущества в сравнении с другими методами, так как позволяет точно и быстро диагностировать оппортунистические инфекции ЦНС у пациентов с ВИЧ — инфекцией и унифицировать методы диагностики [4,5,6].

Целью нашей работы было выявление ДНК *Toxoplasma gondii*, ДНК *Mycobacterium tuberculosis* — *Mycobacterium bovis* комплекс, ДНК *CMV*, ДНК *EBV*, ДНК *HSV 1/2*, ДНК *HHV6*, ДНК *VZV* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно — флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в формате Real-time ПЦР в СМЖ и цельной крови, полученной от больных на поздних стадиях ВИЧ — инфекции с различными клиническими диагнозами.

Материалы и методы. В период с января 2016 по август 2016 г. было обследовано 42 пациента с ВИЧ-инфекцией в возрасте 21–47 лет с поражениями ЦНС, проходивших стационарное лечение в ГПНБ №2 г. Донецка. В качестве материала для исследования использовали спинномозговую жидкость и цельную кровь. В ликворе оценивали наличие ДНК *Toxoplasma gondii*, ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M. microti*), ДНК *CMV*, ДНК *EBV*, ДНК *HHV6*, ДНК *VZV*, ДНК *HSV 1/2*, в крови определяли вирусную нагрузку ДНК *CMV*, *EBV*, *HHV6*, *Mycobacterium tuberculosis complex* и РНК ВИЧ. Из каждого образца проводилось выделение тотальной ДНК с использованием набора «Рибо-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора г. Москва). Полученные после экстракции образцы ДНК анализировались в ПЦР-тестах производства ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва). Полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в формате Real-time проводилась с использованием прибора «Rotor Gene 3000/6000» производства Corbett Research (Австралия).

Результаты. На момент постановки клинического диагноза врачи не обладали сведениями о результатах лабораторного исследования методом ПЦР. Исследования проводились ретроспективно, после постановки диагноза. Клинические диагнозы были следующие: «менингоэнцефалит неизвестной этиологии», «менингоэнцефалит туберкулезной природы», «токсоплазмозный энцефалит», «серозный менингит неизвестной этиологии» и «энцефалопатии различного генеза».

У 7 пациентов был поставлен диагноз «менингоэнцефалит неизвестной этиологии». В одном из этих случаев методом ПЦР в ликворе была выявлена только ДНК *Toxoplasma gondii*, впоследствии патологоанатомический диагноз подтвердил «генерализованный токсоплазмоз с поражением головного мозга». У второго больного в ликворе определили ДНК *CMV* с концентрацией 1067 копии/мл, а в плазме крови ДНК *CMV* $2,6 \times 10^4$ копии/мл. В третьем случае в ликворе обнаружили только ДНК *EBV* в концентрации 100 копий/мл, а в плазме крови ДНК *EBV* не выявлена. В трех случаях — методом ПЦР ничего не обнаружено. У одного пациента выявили ДНК *HSV1/2* типа. Вирусная нагрузка РНК *ВИЧ* составила от менее 500 до $2,71 \times 10^5$ копии/мл.

У 10 пациентов был диагноз «менингоэнцефалит туберкулезной природы». В ликворе ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* обнаружили только у 1 пациента. В одном случае выделили ДНК *HHV6* в концентрации $1,7 \times 10^3$ копии/мл в ликворе и 5,22 Lg на 10^5 клеток в цельной крови. Остальные образцы СМЖ были отрицательны. В крови обнаруживали ДНК *CMV* и *EBV* в концентрациях ниже 2 Lg на 10^5 клеток. Вирусная нагрузка РНК *ВИЧ* составила от $5,05 \times 10^3$ до 3×10^6 копии/мл.

У двоих больных с диагнозами «милиарный туберкулез легких» и у одного с диагнозом «токсоплазмозный энцефалит» в крови выявили ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*. В СМЖ от этих пациентов ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* выявлено не было. Значения лимфоцитов CD4+ среди этой группы больных составил от 10 до 140 клеток в 1 мкл.

Диагноз «токсоплазмозный энцефалит» был поставлен 7 больным. У двоих этот диагноз сочетался с ЦМВ-инфекцией. ДНК *Toxoplasma gondii* в ликворе была обнаружена только в 1 случае. В одном — ДНК *HSV1* в ликворе. В остальных случаях методом ПЦР в ликворе ничего не выявили. В крови обнаруживали ДНК *CMV* и *EBV* в концентрациях ниже 2 Lg на 10^5 клеток. Вирусная нагрузка РНК *ВИЧ* составила от менее 500 до $2,8 \times 10^6$ копии/мл.

У двух пациентов с диагнозами «серозный менингит неизвестной этиологии» и «энцефалопатия токсикометаболического генеза» в СМЖ и крови выявили ДНК *Varicella zoster virus*. Значение лимфоцитов CD4+ среди этой группы больных составило 234 и 471 клеток в 1 мкл соответственно.

По остальным пациентам диагнозы были распределены как «энцефалопатии различного генеза», «объемное поражение головного мозга», «патологии со стороны ЦНС не выявлено». В одном случае в СМЖ выявили ДНК *Mycobacterium tuberculosis*

complex, в анамнезе у этого пациента «диссеминированный туберкулез легких». ДНК других возбудителей в СМЖ не было найдено. В крови обнаруживали ДНК *CMV* и *EBV* в концентрациях ниже 2 Lg на 10^5 клеток. Вирусная нагрузка РНК *ВИЧ* составила от менее 500 до $2,7 \times 10^5$ копии/мл.

Заключение. Было протестировано 86 образцов клинического материала от 42 больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Клинические диагнозы среди этих пациентов распределились следующим образом: 12,5 % «менингоэнцефалит неизвестной этиологии», 17,9 % «менингоэнцефалит туберкулезной природы», 12,5 % «токсоплазмозный энцефалит», 3,6 % «серозный менингит неизвестной этиологии» и 47 % «энцефалопатии различного генеза». Вирусная нагрузка РНК *ВИЧ* не являлась маркером развития оппортунистических инфекций.

Выявление ДНК *Toxoplasma gondii* у всех пациентов свидетельствовало о токсоплазмозном энцефалите.

Для диагностики инфекций, ассоциированных с *CMV*, *EBV*, *HHV6* и *VZV*, целесообразней использовать в качестве биологического материала не только СМЖ, но и кровь. Это позволяет повысить прогностическую ценность исследования.

Роль выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* в цельной крови как возможного прогностического маркера требует дополнительного исследования.

Использование метода ПЦР улучшает этиологическую диагностику оппортунистических инфекций ЦНС у пациентов с ВИЧ — инфекцией и помогает в короткие сроки провести дифференциальную диагностику как бактериальных, так и вирусных инфекций ЦНС.

I. Nosova, T. Goryacheva

DIAGNOSTIC VALUE OF MOLECULAR GENETIC METHODS OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS DETECTION IN THE PATIENTS WITH HIV

Summary. The opportunistic infections are markers of immunological ill-being, which develops in the patients living with HIV due to progressive course of disease. Clinical recognition of the opportunistic infections is difficult. A wide range of clinical signs accounts for the specificity of the diagnostics of this group of infections, placing a priority on the laboratory techniques. The paper introduces the use of the polymerase chain reaction technique for differential diagnostics and prognosis of progress of disease in case of opportunistic infections of CNS. Cerebrospinal fluid and whole blood were used as the biomaterial for the study. The post-hoc analysis of the laboratory research results allowed to carry out the etiological diagnostics of the opportunistic infections within a short time for the treatment optimization purposes, taking clinical features of their progress into account.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВИЧ-инфекция / [А. Г. Рахманова, Е. Н. Виноградова, Е. Е. Воронин, А. А. Яковлев]. – М., 2004. – 696 с.
2. Покровский В. В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИД / В. В. Покровский. – М.: Медицина, 1996. – 249 с.
3. Алексеева Л. П. Туберкулез с лекарственной устойчивостью микобактерий у больных с ВИЧ-инфекцией / Л. П. Алексеева // Актуальные проблемы туберкулеза на рубеже XX-XXI столетий: материалы III Всерос-

- сийской научно-практической конференции с международным участием. – М., 1999. – С. 38.
4. Impact of *Pneumocystis carinii* and cytomegalovirus on the course and outcome of atypical pneumonia in advanced human immunodeficiency virus disease / S. A. Bozzette, J. Arcia, A. E. Bartok [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1992. – Vol. 165, № 1. – P. 93-98.
 5. *Harrison's Principles of Internal Medicine* / Edit. Dennis L. Kasper. – [16th Ed.]. – Boston, 2005. – 8401 p.
 6. Hadley W. K. *Pneumocystis* / W. K. Hadley, L. Valerie // *Manual Clin. Microbiol* / eds. P. R. Murray et al. – Boston, 1995. – Vol. 62. – P.738 -748.
 7. Comparison of cytomegalovirus loads in plasma and leukocytes of patients with cytomegalovirus retinitis. The Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group / D. A. Jabs, M. Forman, C. Enger [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37, № 5. – P. 1431-1435.
 8. Severe hepatitis caused by Epstein-Barr virus without infection of hepatocytes / H. Kimura, T. Nagasaka, Y. Hoshino [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2001. – Vol. 32, № 7. – P. 757-762.
 9. Markin R. S. Manifestations of Epstein-Barr virus-associated disorders in liver / R. S. Markin // *Liver.* – 1994. – Vol. 14, № 1. – P. 1-13.
 10. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma / S. Fafi-Kremer, K. Brengel-Pesce, G. Barguès [et al.] // *J. Clin. Virology.* – 2004. – Vol. 30. – P. 157-164.