

Д-р Нина Янчева

Отделение за придобит имунен дефицит, СБАЛИПБ  
„Проф. Иван Киров“

# Диагностика на ХИВ/СПИН

## Резюме

Диагнозата ХИВ/СПИН се базира на клинични, епидемиологични и лабораторни данни. Съществуват редица лабораторни тестове за диагностициране на инфекцията и мониториране на прогресията на заболяването. Диагностичните тестове се класифицират като скринингови и потвърдителни. Скрининговите тестове са с висока чувствителност, докато потвърдителните са с висока специфичност. Тестовете с висока чувствителност понякога дават фалшиво отрицателни резултати, докато тестовете с висока специфичност – фалшиво положителни. В настоящата статия е представен диагностичен алгоритъм за първична ХИВ-диагноза.

**Ключови думи:** ХИВ/СПИН, диагностика, скринингови тестове, потвърдителни тестове

## Diagnostic of HIV/AIDS

Nina Yancheva

Department for acquired immunodeficiency, Specialized Hospital For Infectious and Parasitic Diseases, Sofia

## Abstract

The diagnosis of HIV/AIDS is based on clinical, epidemiological and laboratory data. An arsenal of laboratory methods is available to diagnose infection and monitor disease progression in individuals infected by HIV. These tests can be classified as screening assays and confirmatory (supplemental) assays. Screening tests possess a high degree of sensitivity, whereas confirmatory assays have a high specificity. Tests with high sensitivity produce few false-negative results, whereas tests with high specificity produce few false-positive results. At this article is presented algorithm for primary HIV diagnosis.

**Key words:** HIV/AIDS, diagnostic, screening tests, confirmatory tests

HIV-1 и HIV-2 са ретровируси, принадлежащи към семейството на лентивирусите. Вирусите инвазират CD4 клетки. Постепенното намаляване на броя на тези клетки води до тежък имунен дефицит с развитието на множество бактериални, вирусни или гъбични инфекции. Имунният дефицит е причина и за развитието на други тежки неинфекциозни заболявания, познати като СПИН-индикаторни. Крайният стадий на инфекцията е СПИН<sup>6,7</sup>.

Диагнозата се основава на епидемиологични, клинични и лабораторни данни.

**I. Епидемиологични данни:** епидемиологичната анамнеза изяснява наличието на рискови фактори:

✦ небезопасен полов контакт с инфектиран партньор

✦ инжектиране (при интравенозни наркомани) или трансфузия на контаминирана кръв или кръвни продукти

✦ майчинофетална трансмисия.

**II. Клинични данни за ХИВ-инфекция**

**1. Първична ХИВ-инфекция.** В табл. 1 са изброени наличните симптоми при първична ХИВ-инфекция<sup>7</sup>.

**2. Напреднала ХИВ-инфекция с тежък имунен дефицит** – насочващи към диагнозата (фиг. 1) са т.нар. опортюнистични инфекции и СПИН-гефиниращи състояния.

В табл. 2 е отбелязана класификация на ХИВ-инфек-

Симптоми	Процент на пациентите, при които е наличен симптомът
Фебрилитет	>80–90
Адинамия	>70–90
Обрив	>40–80
Главоболие	32–70
Лимфаденомегалия	40–70
Фарингит	50–70
Миалгии или артралгии	50–70
Гадене, повръщане или диария	30–60
Нощни изпотявания	50
Асептичен менингит	24
Разязвявания в устна кухина	10–20
Генитални разязвявания	5–15
Тромбоцитопения	45
Левкопения	40
Повишени чернодробни ензими	21

Табл. 1. Налични симптоми при първична ХИВ-инфекция

цията, където се отразени опортюнистичните инфекции и СПИН-определящите заболявания<sup>6,7</sup>.

Категория А	Категория В	Категория С – СПИН-гефиниращи състояния
Асимптомна HIV инфекция	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Бациларна ангиоматоза</li> <li>✦ Орофарингеална кандигоза</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Кандигоза на бронхи, трахея или бели дробове</li> <li>✦ Езофагеална кандигоза</li> </ul>
Остра (първична) HIV инфекция с придружаващо заболяване или анамнеза за остра HIV инфекция	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Кандигозен вулвовагинит, персистиращ, чест или лошо отговарящ на терапия</li> <li>✦ Цервикална дисплазия (умерена или тежка)/цервикален карцином in situ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Инвазивен цервикален карцином</li> <li>✦ Кокцидиомикоза – дисеминирана или екстрапулмонарна</li> <li>✦ Екстрапулмонална криптококоза</li> <li>✦ Криптоспоригиози (повече от един месец)</li> <li>✦ Цитомегаловирусно заболяване (друго освен черен дроб, слезка и лимфни възли)</li> <li>✦ Цитомегаловирусен ретинит (със загуба на зрение)</li> </ul>
Персистираща генерализирана лимфаденопатия	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ Конституционални симптоми като треска (38.5°C) или диария, продължаващи повече от един месец</li> <li>✦ Орална левкоплакия, рецидивиращ</li> <li>✦ продължение на предишната подточка</li> <li>✦ Идиопатична тромбоцитопенична пурпура</li> <li>✦ Листериоза</li> <li>✦ Тазововъзпалителна болест, особено ако е усложнена от тубоовариален абсцес</li> <li>✦ Периферна невропатия</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✦ HIV-свързана енцефалопатия</li> <li>✦ Herpes simplex: хронични язви (повече от един месец); или бронхити, пневмонити или езофагити</li> <li>✦ Дисеминирана или екстрапулмонарна хистоплазмоза</li> <li>✦ Изоспориаза (повече от един месец)</li> <li>✦ Кароси's саркома</li> <li>✦ Лимфом на Burkitt</li> <li>✦ Имунобластен лимфом</li> <li>✦ Първичен лимфом на ЦНС</li> <li>✦ Дисеминиран или екстрапулмонарен Mycobacterium avium complex или M. kansasii</li> <li>✦ Туберкулоза (белогробна или екстрапулмонарна)</li> <li>✦ Пневмоцистна пневмония</li> <li>✦ Рецидивираща пневмония</li> <li>✦ Прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия</li> <li>✦ Рецидивиращ салмонелен сепсис</li> <li>✦ Мозъчна токсоплазмоза</li> <li>✦ ХИВ – свързана кахексия</li> </ul>

Табл. 2. Класификация на ХИВ инфекцията

### Скринингови тестове

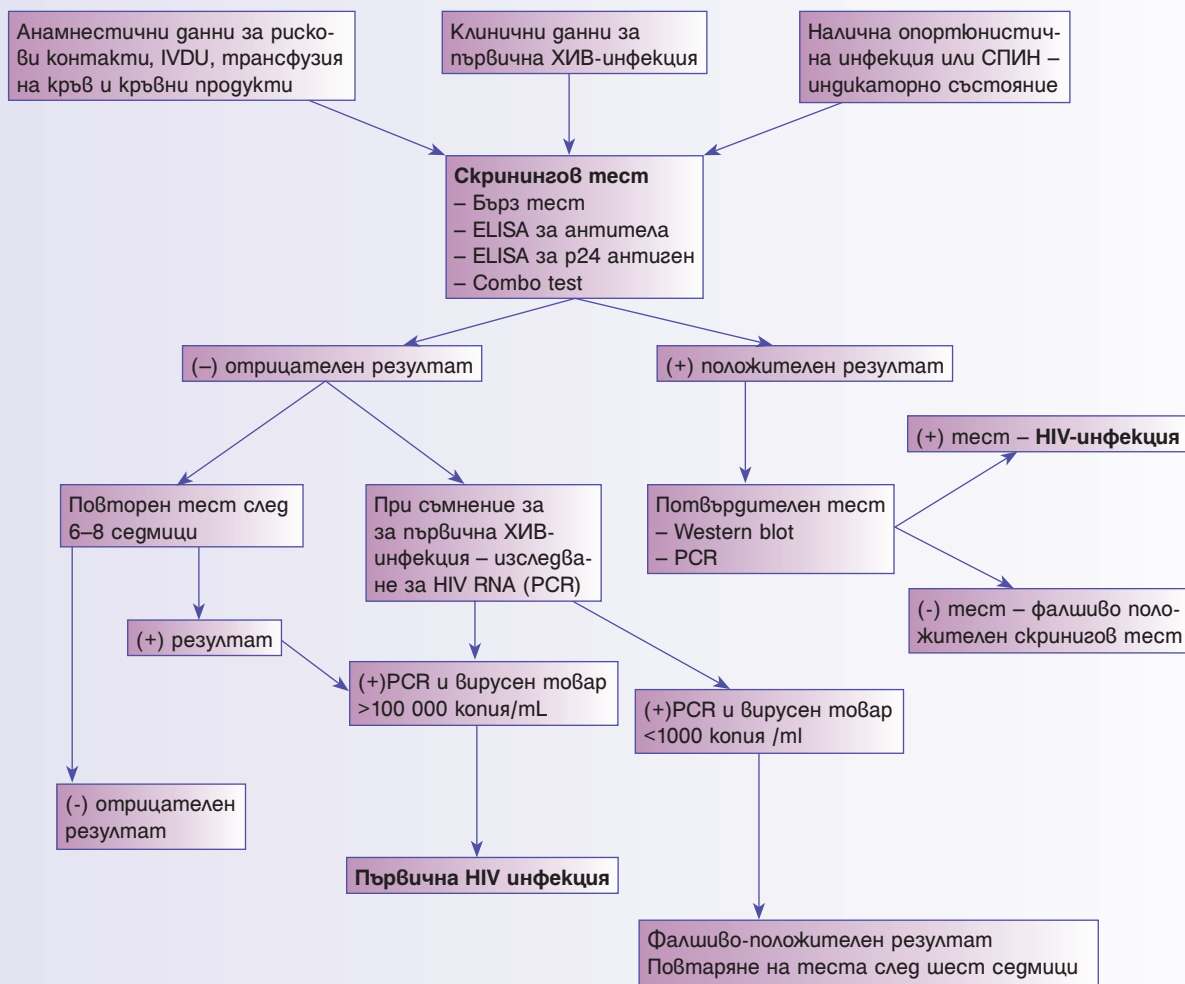
#### ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) тестове за антитела

ELISA тестове за антитела срещу HIV се позитивират около четири седмици след инфектирането, като обичайно по време на острата фаза тези тестове са отрицателни или неопределени.

**Принцип на метода:** диагностикумът е плаки, които са натоварени с HIV антигени. Серумът или плазмата на пациента се инкубира с диагностикума. Когато в серума или плазмата има HIV-специфични антитела, те се свързват с антигените на плаката. За да се визуализират получените антиген-антитяло комплекси, се добавя второ антитяло, свързано с ензим. Резултатът е цветна реакция, която се измерва фотометрично. Оптическата плътност корелира с коцентрацията на HIV-специфичните антитела. По-висока коцентрация

на антитела води до по-висока плътност. Базирайки се на този скринингов тест, са създадени по-прецизни съвременни тестове – MEIA (Microparticle enzyme immunoassay). Използват се микрочастици с вирусни антигени и антитела. Скрининговите тестове са с висока чувствителност, но с по-ниска специфичност в сравнение с потвърдителните тестове. Тестовете са със специфичност 99.5%. Това означава, че една от 200 HIV-негативни проби е с фалшива реакция. Фалшивите реакции се дължат на стимулирането на имунната система, например от вирусна инфекция, бременност, ваксинация, аутоимунна болест<sup>1, 2, 3, 7, 9</sup>.

Най-рано продукцията на HIV-специфични антитела започва две седмици след трансмисията. HIV-специфичните антитела могат да бъдат установени след четири седмици от трансмисията в 60–65% от случаите. В 80% се установяват след шестата седмица, в 90% – след осмата седмица, и в 95% от случаите – след дванадесетата седмица.



Фиг. 1. Първична HIV диагноза

## ELISA тест за антиген p24

Определянето на p24 е възможно около пет дни преди сероконверсията (появата на антитела).

**Принцип на метода:** използваните диагностички са плаки, натоварени с антитела, които реагират специфично при наличие на антиген p24 в изследваната кръв на пациента. Получените антитяло–антиген комплекси отново се визуализират с добавяне на второ антитяло, свързано с ензим<sup>3, 6, 7</sup>.

## Бързи тестове

Освен серум или плазма може да се изследва капилярна кръв, урина или орален трансудат (не слюнка). Чувствителността е по-ниска, ако не се изследват плазма или серум. Резултатите са готови след 15–30 минути. Най-често бързите методи са имунохроматографски. Има също и аглутинационни методи и имунофилтрация. Те не са показателни при първична ХИВ-инфекция. 1/3 от пациентите с първична HIV инфекция са с фалшиво негативен резултат от бързите тестове. Имат приложение при спешни ситуации – убождане на медицински персонал при операции, раждане<sup>1, 5, 7, 14</sup>.

## Combo test

Определя едновременно и антитела и p24 антиген<sup>4, 5, 9</sup>.

## Потвърдителни тестове

### Western blot тест

**Принцип на метода:** вирусните протеини (антигени) са разделени по тяхното молекулно тегло чрез електрофореза и трансферирани на една мембрана, която се използва като стрип тест<sup>1, 2, 3, 7</sup>. Стрипът се инкубира със серум или плазма от пациента. Ако има HIV-специфични антитела, те се свързват с антигените. Комплексите антитяло–антиген стават видими чрез добавяне на второ антитяло, свързано с ензим и добавяне на субстрат. HIV протеините се групират в три функционални групи:

- ★ протеини на обвивката (env) – gp41, gp160, gp120
- ★ полимеразни протеини (pol) – p31/p34, p39/p40, p51/p52, p66/p68
- ★ ядрени протеини (gag) – p17/p18, p24/p25, p55.

Формирането на антитела след инфекцирането следва една специфична кинетика: докато p24 и gp120

се откриват рано, то р31 се открива в по-късните стадии на инфекцията. Тестът Western blot се счита за позитивен, когато поне два от три банди са видими. Според критериите на СЗО тестът е позитивен, когато се установяват антитела срещу поне два от епв протеините.

### Индиректна имунофлуоресценция

При този метод се използват клетки (обикновено лимфоцити), инфектирани с HIV и фиксирани на микроскопска плака. Добавя се серумът на болния, който, ако има антитела, реагира с интрацелуларния HIV. Плаката се промива и се добавят антиимуноглобулинови антитела, ковалентно свързани с флуоресцентно багрило. Реакцията се отчита на имунофлуоресцентен микроскоп. Положителните реакции са флуоресциращи<sup>5, 7, 9, 10</sup>.

### Молекулярни методи за определяне на HIV RNA (PCR, bDNA)

Тези методи са полезни при пациенти с първична ХИВ-инфекция. Те обикновено са с отрицателен анти-телен тест, но висок вирусен товар (>100 000 копия/ml). Ако вирусният товар е нисък (<1000 копия/ml) в острия стадий – обикновено се касае за фалшиво положителен резултат, защото принципно при остра ХИВ-инфекция вирусният товар е много висок (>100 000, даже милиони копия/ml)<sup>7, 8, 13</sup>. Пациенти, които имат неопределен тест за HIV антитела, нисък HIV вирусен товар и неясни рискови фактори или симптоми на първична HIV инфекция, подлежат на повторно тестване

след 4–6 седмици. Количественото определяне на HIV RNA (вирусен товар) е един от основните компоненти на мониторирането на HIV инфекцията. По отношение на първичната HIV диагноза, тестът HIV PCR е показан при определени случаи – подозрение за първична инфекция или вертикална трансмисия.

Най-ранният лабораторен маркер е HIV RNA, която може да се установи около седем дни преди р24 антигена. В много от случаите HIV RNA може да бъде установена около две седмици след трансмисията<sup>7, 8, 14</sup>.

### HIV диагностика при новородени

При новородени от HIV позитивни майки майчините антитела могат да персистират повече от 18 месеца. Антителата се пренасят трансплацентарно от 32-рата седмица на бременността, въпреки че нямат протективен ефект. За отхвърляне на HIV трансмисията са нужни два отрицателни PCR резултата. Първият HIV PCR трябва да бъде проведен след първия месец от раждането (чувствителност 96%, специфичност 99%)<sup>7, 8</sup>. Изследването се повтаря след третия месец, когато специфичността и чувствителността са 100%.

### HIV диагностика след експозиция

След убождане е препоръчителна постекспозиционна профилактика (PEP), която трябва да започне в рамките на 24 часа от експозицията<sup>8, 14</sup>. Препоръчително е провеждане на бърз тест за HIV. HIV PCR е показан, ако има индикации за първична инфекция.

Литература	
1. Constantine NT. Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. <i>Aids</i> 1993;7:1–13.	5. Donie F, Upmeier B, Hoess E, et al. HIV screening with the Elecsys automated analyzer: combined testing for anti-HIV and HIV Ag within 18 minutes. In: Program and abstracts of the XII International AIDS Conference; June 28-July 3, 1998; Geneva. Abstract 163/41102.
2. Constantine, N, Cafarella T, Cleghorn F, et al. Simplified Detuning Strategies. Association of Public Health Laboratories Conference on Aspects of Human Retroviruses and Hepatitis C Testing; March 6, 2000; Charlotte, NC.	6. Feinberg MB. Changing the natural history of HIV disease. <i>Lancet</i> . 1996;348:239–46.
3. Constantine NT, Saville, RD, Dax, EM. Retroviral Testing and Quality Assurance: Essentials for Laboratory Diagnosis. Ann Arbor, MI: Malloy Printers; 2005.	7. Hoffmann/Rockstroh. HIV 2012/2013
4. Courouce AM and the Retrovirus Work Group at the S.F.T.S. Combined screening tests for anti-HIV antibodies and p24 antigen. <i>La Gazette de la Transfusion</i> . 1999;155:4-18.	8. Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal BD, O'Brien TR, Weiblen BJ, Hecht FM, Jack N, Cleghorn FR, Kahn JO, Chesney MA, Busch MP. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. <i>JAMA</i> . 1998;280:42–8.
	9. Martinez-Martinez P, Martin del Barrio E, De Benito J, Landinez R. New lineal immunoenzymatic assay for simultaneous detection of p24 antigen and HIV antibodies. – <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i> . 1999;18:591-4.
	10. McFarland W, Kellogg TA, Louie B, Murrill C, Katz MH. Low estimates of HIV seroconversions among clients of a drug treatment clinic in San Francisco, 1995 to 1998. <i>J Acquir Immune Defic Syndr</i> . 2000;23:426-9.
	11. Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, Pau CP, Byers R, Green T, Hu DJ, Vanichseni S, Young NL, Choopanya K, Mastro TD, McDougal JS. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. <i>AIDS Res Hum Retroviruses</i> . 2002;18:295-307.
	12. Wittek M, Sturmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. <i>Exp Rev Mol Diagn</i> . 2007;7:237–46.
	13. Weber B, Fall EH, Berger A, Doerr HW. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. <i>J Clin Microbiol</i> . 1998;36:2235-9.
	14. Update: provisional Public Health Service recommendations for chemoprophylaxis after occupational exposure to HIV. <i>MMWR Morb Mortal Wkly Rep</i> . 1996;45:468-80.