ДИАГНОСТИКА ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ТОКСОПЛАЗМОЗА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Сафонова А.П., Шипулина О.Ю., Пиксасова О.В., Долгова Е.А.
ФГУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

В Российской Федерации неуклонно растет число инфицированных ВИЧ граждан. На 01.05.07 в нашей стране зарегистрировано 400172 ВИЧ инфицированных лиц. В последние годы отмечается существенный рост числа больных ВИЧ-инфекцией, выявляемых на поздней стадии заболевания, имеющих глубокий иммунодефицит и тяжелые оппортунистические заболевания. Токсоплазмоз наряду с туберкулезом, цитомегаловирусной инфекцией и пневмоцистной пневмонией в течение последних лет входит в число ведущих оппортунистических заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией, являясь основной причиной поражения ЦНС. По данным проведенных за рубежом исследований, токсоплазмоз головного мозга диагностируют у 3-10% больных ВИЧ-инфекцией на стадии СПИДа, не получающих антиретровирусную терапию.

Раннее выявление церебрального токсоплазмоза при ВИЧ-инфекции представляет большие трудности в связи с отсутствием патогномоничных клинических признаков, малой информативностью результатов рутинных лабораторных методов исследования. Согласно анализу причин летальных исходов при токсоплазменном поражении головного мозга основной причиной смерти пациентов (50% случаев) явилась поздняя постановка этиотропного диагноза и отсутствие адекватного лечения вследствие несвоевременного обращения больных за медицинской помощью, также имела место неправильная интерпретация имеющихся клинических проявлений болезни. Причиной неудачного лечения в половине случаев была тяжелая патология ЦНС, легких, кишечника, надпочечников при сочетании церебрального токсоплазмоза с манифестной ЦМВ-инфекцией, туберкулезом, пневмоцистной пневмонией, астроцитомой головного мозга при очень низких параметрах иммунитета.

Причинами низкой диагностической чувствительности выявления токсоплазмоза методом ПЦР являются низкая аналитическая чувствительность реакции – недоступность возбудителя или его недостаточное количество в клиническом материале, а так же выбор мишени (мультикопийный ген) и методики.

Первой тест-системой для диагностики токсоплазмоза, созданная

в ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, с электрофоретической детекцией была «АмплиСенс-100-К Toxoplasma gondii – 325». Диагностической мишенью для нее был многокопийный ген Toxoplasma gondi **TGR1E,** размером 353 п.о. В настоящее время ген **TGR1E** не используется в качестве диагностической мишени для ПЦР, в связи с гетерогенностью нуклеотидных последовательностей среди различных его копий и невозможности выбора в связи с этим специфических праймеров. Диагностическая чувствительность этой тест-системы была равна 30% при 100% диагностической специфичности в исследовании ликвора на наличие ДНК Toxoplasma gondii. Возникла необходимость поиска оптимальной мишени для идентификации ДНК Toxoplasma gondii в соответствие с современными молекулярно–генетическими сведениями.

В настоящее время для диагностики токсоплазмоза используется новая тест-система "АмплиСенс® Toxoplasma gondii –– FRT" с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Цель работы заключалась в апробации тест-систем на различном клиническом материале с целью диагностики токсоплазмоза и для мониторинга эффективности терапии.

Материалы и методы

В период с января 2006 по октябрь 2007 гг. поступило 211 проб ликвора от больных, проходивших стационарное лечение в ИКБ №2. Возраст пациентов колебался от 18 до 64 лет. Всем больным с поражением ЦНС проводили диагностическую люмбальную пункцию с оценкой наличия ДНК Toxoplasma gondii, ДНК Mycobacterium tuberculosis complex (M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum, M. microti), CMV, HSV I/II, Candida albicans использованием тест-систем производства ГУ ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Материалом для исследования помимо ликвора служили БАЛЖ и биоптаты бронхов.

Из каждого образца проводилось выделение тотальной ДНК с использованием набора «ДНК Сорб-Б» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Полученные после экстракции образцы ДНК анализировались в ПЦР-тестах:

- с использованием набора для качественного выявления ДНК Toxoplasma gondii в режиме реального времени **«АмплиСенс® Toxoplasma gondii–FRT»** (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Диагностической мишенью для данной тест-системы был выбран повторяющийся ген Toxoplasma gondii размером 529 п.о., функция которого неизвестна (Homan W.L. et al., 2000; Reischl U. et al., 2003). Аналитическая чувствительность этой тест-системы составляет 4 тахизоитов/мл.

- с использованием набора для качественного выявления ДНК

Toxoplasma gondii **“АмплиСенс Toxoplasma gondii-211”** с электрофоретической детекцией. Диагностической мишенью стал многокопийный ген Toxoplasma gondii **B1,** размер 2214 п.о. Ген B1 консервативен и представляет собой 35 тандемных повторов размером 2,2 т.п.о. Аналитическая чувствительность этой тест-системы составляет 16 тахизоитов/мл.

ДНК цитомегаловируса нормализовалась на количество лейкоцитов и определяется с использованием набора для количественного выявления ДНК CMV в режиме реального времени **«АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр–FRT»** (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Чувствительность тест-систем составляет 5 копий ДНК CMV/10^5 клеток. Линейный диапазон измерения тест-системы: 10-1000 000 копий ДНК CMV/10^5 клеток.

Для выявления ДНК Mycobacterium tuberculosis complex (M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum, M. microti) использовалась тест-система **«АмплиСенс® Mycobacterium tuberculosis complex–Fl»** (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Полимеразная цепная реакция с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в формате Real-time проводилась с использованием прибора «Rotor Gene 3000/6000» производства Corbett Research, «iQ5» ABIPrism, производства BioRad США, Applied Biosystems, США.

Результаты

Из 211 образцов ликвора ДНК Toxoplasma gondii была выявлена у 14 больных. Из них в 7 пробах ДНК Toxoplasma gondii была выявлена с помощью тест-системы с электрофоретической детекцией «АмплиСенс Toxoplasma gondii-211», оставшиеся 7 образцов были дополнительно выявлены с помощью тест–системы «АмплиСенс® Toxoplasma gondii – FRT» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (Таблица 1).

Таблица 1. Выявление ДНК ДНК Toxoplasma gondii в ликворе тест-системами с разной аналитической чувсвительностью.

Тест- системы для выявления ДНК Toxoplasma gondii	Выявлено ДНК Toxoplasma gondii в ликворе n = 14	Диагностическая выявляемость от всех образцов
«АмплиСенс Toxoplasma gondii-211»	7	50%
«АмплиСенс Toxoplasma gondii – FRT»	14	100%

Одновременно осуществлялась дифференциальная диагностика с другими инфекциями: ДНК Mycobacterium tuberculosis complex, ДНК HSV I/II, ДНК Candida albicans, ДНК CMV, которые в этих образцах выявлены не были.

У 1 человека в БАЛЖ была обнаружена ДНК Toxoplasma gondii и в 1 случае в биоптате. Всего было исследовано 290 образцов БАЛЖ и 193 биоптата бронхов.

Заключение

1. Повышение выявляемости ДНК Toxoplasma gondii в клинических образцах связано с повышением диагностической чувствительности тест-системы "АмплиСенс® Toxoplasma gondii – FRT" с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» по сравнению к "АмплиСенс® Toxoplasma gondii-211" с электрофоретической детекцией.

2. Выявление ДНК Toxoplasma gondii в ликворе указывает на церебральный токсоплазмоз у больного ВИЧ-инфекцией.

3. Обнаружение ДНК Toxoplasma gondii в БАЛЖ и/или биоптатах бронхов свидетельствует о поражении легких токсоплазменной этиологии и, возможно, является маркером риска развития церебрального токсоплазмоза.