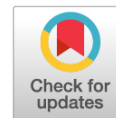


УДК 616-097.1

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar84029>

Научная статья



Направления совершенствования лабораторной диагностики социально значимых гемоконтактных вирусных инфекций в военно-медицинских организациях

Е.С. Орлова, Ю.И. Буланьков, А.А. Сечин

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

Представлены актуальность применения молекулярно-биологических методов диагностики ВИЧ-инфекции и гемоконтактных вирусных гепатитов в военно-медицинских организациях и опыт большинства зарубежных стран, активно использующих современные молекулярные методологии для диагностики инфекционных заболеваний. Показана перспективность использования альтернативного носителя биологического материала «сухой капли» сыворотки или плазмы для диагностики инфекций с применением экспресс-тестов и молекулярно-биологических методов, а также возможность проведения дистанционного диспансерного динамического наблюдения при социально значимых гемоконтактных вирусных инфекциях у военнослужащих.

Предлагается возможная схема лабораторного тестирования на ВИЧ-инфекцию с использованием в качестве экспертного метода полимеразной цепной реакции, а также тест-систем, позволяющих определять давность инфицирования, особенно в случаях с сомнительными результатами иммунного блоттинга.

Рассмотрены перспективные молекулярно-генетические методики для внедрения в лабораториях военно-медицинских организаций: «гнездовая» (nested) полимеразная цепная реакция, петлевая изотермическая амплификация (Loop mediated isothermal amplification), цифровая полимеразная цепная реакция, использование комбинированных тестов на основе полимеразной цепной реакции (масс-спектрометрический анализ ампликонов), секвенирование. Сформулированы основные направления совершенствования лабораторной диагностики социально значимых гемоконтактных вирусных инфекций в военно-медицинских организациях: оптимизация логистики преаналитического этапа диагностики с расширением спектра валидированных методов консервации и доставки проб в лаборатории (в т. ч. «сухая капля»); сокращение длительности аналитического этапа диагностики путем более широкого клинического использования экспресс-тестов и полимеразной цепной реакции (включая изотермический вариант); повышение чувствительности и специфичности методов серологической и молекулярной диагностики; совершенствование методологии валидации и интерпретации результатов лабораторной диагностики при обеспечении военно-врачебной экспертизы.

Ключевые слова: вирусный гепатит; ВИЧ-инфекция; иммунный блоттинг; иммуноферментный анализ; лабораторная диагностика; молекулярно-биологические методы; социально значимые заболевания; «сухая капля»; цифровая полимеразная цепная реакция.

Как цитировать:

Орлова Е.С., Буланьков Ю.И., Сечин А.А. Направления совершенствования лабораторной диагностики социально значимых гемоконтактных вирусных инфекций в военно-медицинских организациях // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2022. Т. 41. № 3. С. 293–301. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar84029>

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar84029>

Research Article

Directions of the laboratory diagnostics improving of the socially significant hemocontact viral infections in the military medical organizations

Elena S. Orlova, Yuriy I. Bulan'kov, Aleksey A. Sechin

Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

In this study we have shown the relevance of the nucleic acid testing for the diagnosis of the human immunodeficiency virus infection and hemocontact viral hepatitis in the military medical organizations as well as the experience of majority of the foreign countries that actively apply modern molecular methodologies for the diagnosis of infectious diseases. The possibility of using the rapid tests, molecular biology techniques and an alternative carrier of the biological material — the “dry drop” method, the potential of this method of biological material preparation in infectious diseases diagnostics in case of laboratory remoteness and for follow-up observation of patients with socially significant hemocontact viral infections is shown.

New algorithm of human immunodeficiency virus infection laboratory testing using polymerase chain reaction as an expert test followed by methods of determination of recency of acquisition of human immunodeficiency virus antibodies especially in questionable laboratory result cases are proposed.

Promising molecular genetic methods for implementation in laboratories in military medical organizations such as nest-er-polymerase chain reaction, loop-mediated isothermal amplification, digital polymerase chain reaction, mass spectrometry of polymerase chain reaction — amplicons, Deoxyribonucleic acid sequence are observed. We have defined the main approaches to improve laboratory diagnostics of social significant hemocontact viral infections in military medical organizations: optimization of logistics of pre-analytical step with expansion of validated biomaterial samples storage and delivery methods (including “dry drop”); reduction in the duration of analytical phase through increase in the clinical use of polymerase chain reaction testing (including isothermic variant); improving the sensitivity and accuracy of serological and molecular diagnostics; development of validation methodology and laboratory tests results interpretation While ensuring military medical expertise. The necessity of specialists training in new diagnostics techniques and result interpretation, improving regulatory framework on examination and registration of human immunodeficiency virus positive military officers, determination of the legal status of cases with unfinished human immunodeficiency virus diagnostic process in order to ensure timely preventive and treatment care events and to objectify statistical recording of this category.

Keywords: dried blood spot; enzyme-linked immunosorbent assay; HIV infection; laboratory diagnostics; molecular genetic methods; PCR; socially significant diseases; viral hepatitis; Western blot.

To cite this article:

Orlova ES, Bulan'kov Yul, Sechin AA. Directions of the laboratory diagnostics improving of the socially significant hemocontact viral infections in the military medical organizations. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2022;41(3):293–301. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar84029>

Received: 28.10.2021

Accepted: 10.01.2022

Published: 30.09.2022

АКТУАЛЬНОСТЬ

Социально значимые заболевания относятся к числу наиболее актуальных проблем современного здравоохранения и основных угроз для здоровья населения. Лабораторные методы исследования при диагностике инфекционных болезней играют ведущую, а в целом ряде клинических ситуаций решающую роль не только в диагностике, но и в определении конечного исхода заболевания.

В настоящее время перед специалистами стоят новые задачи по повышению надежности и репрезентативности методов диагностики и лечения социально значимых гемоконтактных вирусных инфекций (СЗГВИ), что во многом зависит от уровня информативности лабораторных методов исследования и расширения диагностических возможностей. Рациональное использование тест-систем на основе предложенных принципов на отдельных этапах обследования пациента позволяет избежать ненужных многократных исследований, поскольку использование комплексного подхода к диагностике и выбор высокочувствительных и специфичных тестов позволяют оперативно установить диагноз и активность процесса [1]. Сложившиеся алгоритмы лабораторной диагностики СЗГВИ формировались в отличии от современных клинико-эпидемиологических условиях и требуют совершенствования.

Цель — изучение возможности расширения показаний к сочетанному применению молекулярно-биологических методов и иммунохроматографических экспресс-тестов в алгоритмах лабораторной диагностики СЗГВИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы данные, представленные в открытых литературных источниках, выполнен системный анализ содержания нормативно-правовых актов Российской Федерации (РФ), Министерства здравоохранения РФ (МЗ РФ), Министерства обороны РФ (МО РФ), касающихся лабораторной диагностики СЗГВИ, данных лабораторных исследований, представленных в открытой печати и выполненных специалистами ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ (ВМедА) при проведении экспертной диагностики ВИЧ-инфекции у военнослужащих за период с 2010 по 2021 г. с использованием методов лабораторной диагностики (иммуноферментный анализ (ИФА), иммунный блоттинг (ИБ), молекулярно-биологический метод — полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Актуальность нашего исследования обусловлена тем, что проблема совершенствования профилактики и диагностики инфекционных заболеваний является

важнейшей в системе противоэпидемического обеспечения как населения в целом, так и военнослужащих Вооруженных сил (ВС) РФ [2, 3].

Задачи лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции можно подразделить на две категории: 1) эпидемиологические: оценка и установление диагноза ВИЧ-инфекции; 2) клинические: осуществление диспансерного динамического наблюдения за состоянием ВИЧ-инфицированного, мониторинг эффективности антиретровирусной терапии.

Основным документом на сегодняшний день, регламентирующим алгоритм лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции и гемоконтактных вирусных гепатитов, являются санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», введение которых расширило возможности использования молекулярно-генетических методов в качестве подтверждающих тестов. В рамках данного документа предписывается обязательное проведение анализа степени генетической близости штаммов ВИЧ путем «генотипирования и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей в качестве дополнительного инструмента при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи, или других сложных случаев».

За период с 2010 по 2020 г. среди биологических материалов, доставленных для проведения экспертной диагностики ВИЧ-инфекции у военнослужащих, от 11,1 до 24,3 % имели положительные результаты при определении антигена ВИЧ и антител с помощью диагностических тестов (ИФА и иммунохемилюминисцентный анализ (ИХЛА)) и отрицательные или сомнительные результаты в ИБ при определении антител к отдельным белкам ВИЧ. Биологический материал направлялся повторно в лабораторию экспертной диагностики ВИЧ-инфекции в ВМедА для выполнения референтных исследований в ИФА и экспертных исследований методом ИБ в течение последующих 6 мес. Антиретровирусная терапия (АРВТ) данным военнослужащим в период динамического диспансерного наблюдения (ДДН) не назначалась.

Интерпретация результатов в ИБ в зависимости от спектра определяемых антител к отдельным белкам вируса может быть разной: положительный, отрицательный и сомнительный. Два последних результата также не исключают инфицированность обследуемого, требуют дальнейшего ДДН и обследования в специализированных медицинских организациях, но не накладывают на ВИЧ-позитивного никаких юридических обязательств по снижению риска распространения инфекции. Скорость развития серопревалентности в ИБ от момента инфицирования различна и колеблется от 3 мес до 1 года в зависимости от различных причин [4]. Юридический статус такого пациента неясен. По нашим данным, доля пациентов, не возвращающихся для проведения подтверждающего

исследования в экспертные лаборатории МО РФ и центры по профилактике и борьбе со СПИД МЗ РФ, достигает 34 %.

С 2010 г. ПЦР в качестве референтного метода используется у детей первого года жизни (при перинатальном инфицировании), у взрослых данный метод в качестве референтного был рекомендован только с 2016 г. Но неясен статус ПЦР с точки зрения регистрации заболевания и проведения таких действий, как военно-врачебная комиссия (ВВК). При этом создаются проблемы, связанные с функциональным использованием военнослужащих разных родов и видов ВС с учетом возможных клинических проявлений заболевания, продолжением воздействия вредных факторов военного труда, снижением мобильности военнослужащего до окончания лабораторного обследования (в т. ч. карьерный рост).

Ситуации, требующие экстренного решения в плане назначения АРВТ в условиях военно-медицинских организаций (ВМО), встречаются нередко. Приведем два клинических примера.

Военнослужащий А., 2000 г. р., поступил в ВМО 23.01.2021 г. с диагнозом: инфекционный мононуклеоз. При исследовании 26.01.2021 г. сыворотки больного на наличие маркеров ВИЧ были получены положительные результаты, исследование методом ИБ, выполненное 28.01.2021 г., — результат сомнительный, получен следующий белковый профиль: р25, р34, р52, р 55, гр160. С целью уточнения диагноза ВИЧ-инфекции и обоснованности назначения АРВТ при острой ВИЧ-инфекции 02.02.2021 г. выполнено исследование методом ПЦР-диагностики — получен положительный результат. Положительный результат в повторном ИБ был получен только 11.02. 2021 г.

Военнослужащий Б. 1984 г. р., поступил в ВМО 20.02.2021 г. с диагнозом: постинфекционная астения. При исследовании 01.03.2021 г. сыворотки крови на наличие маркеров ВИЧ были получены положительные результаты; исследование методом ИБ, выполненное 04.03.2021 г., — сомнительный; получен следующий белковый спектр: р25, р55. С целью уточнения диагноза и обоснованного назначения АРВТ при острой ВИЧ-инфекции 10.03.2021 г. выполнено исследование методом ПЦР-диагностики — результат положительный. Положительный результат ИБ с полным белковым спектром получен 16.03.2021 г. Данному пациенту проводилось исследование с целью выяснения его вирусной нагрузки, которая на момент постановки диагноза составляла 1 030 819 копий/мл.

Согласно национальным нормативным актам уже на скрининговом этапе диагностики используются диагностические комбинированные Ag/Ат (антиген/антитело) тесты четвертого поколения. В обновленных рекомендациях не рассматривается вариант тестирования с помощью ИФА-систем третьего поколения [5, 6]. Исследование методом ПЦР в редакциях нормативных документов считается «рекомендованным». Правовой статус такого

термина неясен. В санитарных правилах и методических указаниях нет однозначных указаний на роль эпидемиологических рисков и клиники в процессе сокращения и ускорения лабораторной диагностики. Лабораторный диагностический алгоритм оторван от клинических проявлений иммунодефицита, поэтому искусственно затягивается и дорожает. В референс-лаборатории первично-положительная сыворотка исследуется повторно, при получении отрицательных результатов — дважды. При получении положительных результатов исследования в референс-лаборатории сыворотку исследуют в ИБ.

При применении метода ПЦР в качестве референтного метода диагностики ВИЧ для взрослого контингента возникают вопросы: 1) как трактовать результат экспертного исследования в следующих случаях: если имеют место эпидемиологические риски, но результат ИБ — отрицательный; 2) имеются клинические проявления ВИЧ-инфекции, но не хватает полного перечня белков оболочки ВИЧ для учета положительного результата в ИБ, особенно по сравнению с рекомендацией производителя тест-системы [7, 8]?

Возможность использования в качестве подтверждающего теста ПЦР в СанПиН 3.3686-21 определена следующим образом: «При необходимости сокращения сроков установления диагноза ВИЧ-инфекции и незамедлительного назначения АРВТ пациенту в качестве подтверждающего исследования вместо иммунного или линейного блота может быть проведено определение РНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами... при получении неопределенного результата в ИБ с белковым профилем, включающем белки сердцевин (gag), р24, проводится исследование для диагностики ВИЧ 2 и определение ДНК/РНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами». На фоне все возрастающей чувствительности скрининговых методов чувствительность ИБ сохраняется консервативно низкой, что приводит к увеличению доли «отрицательных и неопределенных ИБ», кратности проведения ИБ и, соответственно, удорожанию лабораторной диагностики, увеличению длительности диагностического периода, дополнительной психологической нагрузке на пациента, отсутствию возможности освидетельствования ВВК и назначения АРВТ.

Специалисты США полностью отказались от ИБ как экспертного метода, заменив его молекулярными методами. В случае сомнительных результатов ПЦР рекомендуется повторить исследование с повторным взятием образцов крови. Обновленный диагностический алгоритм CDC тестирования на ВИЧ-инфекцию предусматривает использование ИФА-теста 4-го поколения на ВИЧ на первом шаге, точно так же, как и в РФ. В случае положительного теста на втором шаге проводится дифференцирующий ВИЧ-1/ВИЧ-2, т. е. уточняется тип вируса. Этот этап является референтным и позволяет определять ложноположительные результаты ИФА первого шага. В случае положительного результата устанавливается диагноз

ВИЧ-инфекции. В случае отрицательного или сомнительного результата второго шага проводится третий шаг — качественный анализ РНК ВИЧ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), и при положительном результате устанавливается диагноз острой ВИЧ-инфекции [9].

Безаппаратные экспресс-тесты (ЭТ) — это тесты, которые можно выполнить без специального оборудования менее чем за 60 мин. В качестве исследуемого материала может использоваться кровь, сыворотка, плазма крови и слюна (околодесенная жидкость). ЭТ различны по методу протекания реакции и спектру определяемых маркеров. В настоящее время их чувствительность и специфичность не уступают аналогичным показателям стандартных ИФА [5].

В соответствии с действующими нормативными документами область применения простых и быстрых тестов в РФ ограничена. Каждое исследование материала с применением простых/быстрых тестов должно сопровождаться параллельным тестированием той же порции крови в стандартных методиках (ИФА, ИХЛА, ИБ). Но с учетом сопоставимо высокой чувствительности и специфичности некоторые ЭТ могли быть включены в алгоритмы лабораторной диагностики. Важным обстоятельством является то, что в качестве биологической пробы может использоваться материал, полученный неинвазивным методом. Иммунохроматографические экспресс-тесты тестирования слюны и околодесенной жидкости имеются и активно используются в скрининговых эпидемиологических исследованиях.

Включение положительных результатов ЭТ в скрининг и референтный этап диагностики в сочетании с экспертными методами на основе ПЦР может существенно сократить диагностический период для большинства больных при минимальной вероятности ложноположительного результата. Технически ЭТ просты в исполнении и не требуют дорогостоящего лабораторного оборудования. Темпы повышения качества и диагностических возможностей ЭТ опережают темпы изменения нормативных документов по их клиническому использованию. Основными «эпидемиологическими» преимуществами ЭТ являются: возможность использования неинвазивных и малоинвазивных методов забора материала; сокращение этапов диагностики и круга лиц, вовлеченных в этот процесс; возможность массового безаппаратного обследования в полевых условиях и самотестирование для ключевых и уязвимых групп населения.

Специалистами научно-исследовательских и медицинских организаций РФ выполнялись исследования по оценке прогностической ценности результатов подтверждающего тестирования ВИЧ-инфекции методами ИБ, анализа р24-антигена и ПЦР и формированию рекомендаций по повышению эффективности алгоритма выявления ВИЧ-инфекции в условиях высокого уровня ее распространенности [10–12]. Выявлена зависимость между уровнем р24-антигемии и формированием

сероконверсии у ВИЧ-инфицированных. Использование критерия прогностичности р24Аг может способствовать сокращению количества исследований и сроков постановки диагноза.

Предлагается возможная схема лабораторного тестирования на ВИЧ-инфекцию с использованием в качестве экспертного метода ПЦР. В случае получения отрицательного результата в ПЦР и ИБ в рамках ДДН пациенту рекомендуется пройти повторное тестирование через 3–6 мес. В случае сомнительных результатов ИБ и ПЦР рекомендуется определение р24Аг.

Весьма перспективным может быть использование тест-систем, позволяющих определять давность инфицирования. Разработаны лабораторные диагностикумы (модификации ИФА или экспресс-тестов), основанные на оценке титра и авидности антител к ВИЧ, с помощью которых можно отличить недавнюю ВИЧ-инфекцию от длительно текущей [13]. Тест предназначен для исследования ВИЧ-1 позитивных образцов с подтвержденным положительным результатом в ИБ. Возможно исследование образцов с неопределенным или негативным результатом исследования в ИБ, в которых подтверждено наличие ВИЧ-1 РНК и/или антигена р24. Специалистами Главного центра Государственного санитарно-эпидемиологического надзора (специального назначения) МО РФ протестированы материалы 16 военнослужащих с впервые установленным диагнозом: ВИЧ-инфекция с целью подтверждения сроков инфицирования. Во всех случаях раннее инфицирование было подтверждено данными эпидемиологических расследований и лабораторного обследования предполагаемых источников инфекции. При сокращении длительности определенного разработчиками порогового критерия (9 мес от момента инфицирования) перспективы использования подобных типов исследований могут значительно расширяться.

Обсуждая вопросы лабораторной диагностики гемоконтактных вирусных гепатитов (ВГ), необходимо отметить, что СанПиН 3.3686–21 смягчают требования по сравнению с действующими нормативными документами к обязательному выполнению молекулярно-генетических исследований на этапе постановки лабораторного диагноза: вирусный гепатит. Но для контроля эффективности противовирусной терапии при лечении данных инфекций комплексная доступность молекулярно-генетических методов остро необходима для обеспечения исполнения действующих протоколов лечения и стандартов оказания медицинской помощи.

В ВМО МО РФ успешно проводится этиотропная противовирусная терапия хронических ВГ В и С, рассматривается возможность проведения АРВТ для ВИЧ-инфицированных военнослужащих, но пока нет референтных центров по углубленной лабораторной диагностике ВГ и ВИЧ-инфекции с определением генотипической резистентности к противовирусным препаратам (прямого противовирусного действия), научно-методическому

обоснованию направлений совершенствования лабораторной диагностики этих заболеваний. Эти вопросы решаются специалистами МЗ РФ, часто без учета возможностей и потребностей силовых ведомств.

Сфера применения простых/быстрых тестов для диагностики ВГ также осталась прежней и требует обязательной постановки лабораторного теста в рутинном ИФА. Одним из нерешенных вопросов лабораторной диагностики остается выявление оккультного гепатита В (ОкГВ) [14]. В качестве перспективного метода диагностики ОкГВ можно рассматривать метод количественной оценки ковалентно-замкнутой кольцевой дезоксирибонуклеиновой кислоты у больных с хроническим вирусным гепатитом В в пункционных биоптатах печени [15, 16]. Серологическими маркерами ОкГВ при хронических заболеваниях печени могут быть суммарные антитела к ядерному антигену вируса гепатита В (anti-HBc) или дефектные частицы вируса гепатита В, выявляемые только усовершенствованными, модифицированными диагностическими тест-системами.

Медицинские организации МО РФ, имеющие в своем составе лаборатории инфекционной иммунологии, находятся на значительном удалении от мест размещения личного состава. Следовательно, отсутствует или ограничена возможность хранения и транспортировки биоматериала в виде крови (сыворотки) или плазмы, так как одним из необходимых условий для проведения достоверных лабораторных исследований является соблюдение температурного и временного режимов. Перспективным направлением совершенствования алгоритма лабораторной диагностики СЗГВИ может быть более широкое и легитимное использование альтернативных образцов биологических жидкостей. Мы считаем, что особое внимание, следует уделить методу «сухой капли», который используется в МО РФ при лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции с применением методов ИФА и ИБ. Сохранность антител к ВИЧ при использовании данного технологического приема транспортировки и консервации биологических проб отмечалась в течение нескольких лет [17, 18].

Этот метод позволяет фиксировать на специальной фильтровальной бумаге не только кровь, но и плазму, сыворотку и другие биологические жидкости (мочу, клетки буккального эпителия, растительную ткань, культуры клеток, колонии микроорганизмов). Почти любой клинический образец может храниться на фильтровальной бумаге для последующего анализа, хотя кровь из пальца является наиболее удобной и широко используемой. Область применения данного метода весьма широка: скрининг СЗГВИ, мониторинг эффективности противовирусной терапии при ВИЧ-инфекции и гемоконтактных вирусных гепатитах, диагностика инфекционных заболеваний, доклинические и клинические исследования, лекарственный метаболизм, фармакокинетические/токсикокинетические исследования, идентификация личности, определение отцовства, идентификация животных,

архивирование клонов, плазмидный скрининг, геномика, трансгенная идентификация, амплификация полного генома, биобанкинг, фармакогеномика, STR анализ, молекулярная биология, мультиплексная ПЦР, секвенирование после ПЦР амплификации, количественная ПЦР. Этот метод обладает рядом неоспоримых преимуществ перед обычными биологическими материалами.

Наше внимание привлекает использование этого метода пробоподготовки биологического материала для диагностики инфекционных заболеваний, особенно учитывая тот факт, что проведение подтверждающего этапа диагностики и оценка эффективности АРВТ могут осуществляться только в лабораториях экспертной диагностики, которые расположены в крупных центрах. С учетом территориальных особенностей нашего государства и тенденций на оптимизацию системы здравоохранения, оказания специализированной медицинской помощи данный метод можно рассматривать как будущее лабораторной диагностики.

В настоящий момент разработаны как импортные, так и отечественные тест-системы, позволяющие выявлять провирусную ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клиническом материале, в т. ч. элюате «сухой капли», методом ПЦР (NucliSENS EasyQ HIV-1 v 2.0, bioMérieux, CAP/CTM HIV-1 qualitative test version 2.0, Roche, АмплиСенс ДНК-ВИЧ-FL, ИнтерЛабСервис). Но включение их в алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции в медицинских организациях МО РФ с использованием данного альтернативного носителя биологического материала в настоящее время имеет следующие ограничения: 1) необходимость использования специальной фильтровальной бумаги; 2) внедрение во всех медицинских организациях единой стандартной операционной процедуры пробоподготовки биоматериала; 3) отсутствие в инструкциях к тест-системам российского производства для ИФА и ИБ на ВИЧ, применяемым в алгоритме экспертной диагностики, указания на валидированное использование элюата «сухих капель» плазмы и сыворотки крови.

Нами были апробированы и внедрены в практику ряд рационализаторских предложений по применению метода «сухой капли»: 1. Способ сохранности антител к ВИЧ методом «сухой капли» для обеспечения длительного хранения сывороток ВИЧ-инфицированных лиц. 2. Способ транспортировки и хранения проб сыворотки крови для обследования на антитела к вирусу гепатита С. 3. Способ транспортировки и хранения проб сыворотки крови для обследования на HBsAg вируса гепатита В. 4. Способ транспортировки и хранения проб сыворотки крови для обследования на иммуноглобулины IgM вируса гепатита А. 5. Полимерный переносной планшет для заготовки биологического материала методом «сухой капли». 6. Способ обеззараживания биологического материала, заготовленного методом «сухой капли», ультрафиолетовым облучением для обеспечения безопасного хранения и транспортировки сывороток ВИЧ-инфицированных военнослужащих.

Одним из перспективных направлений является использование nested — ПЦР с использованием двух пар праймеров и проведением двух последовательных реакций, вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции. Так же как возможные перспективные молекулярно-генетические методики, используемые в лабораториях ВМО МО РФ, можно рассматривать: LAMP-ПЦР, цифровую ПЦР, использование комбинированных ПЦР-тестов (масс-спектрометрический анализ ПЦР-ампликонов), внедрение молекулярно-генетических методов (секвенирование) с целью изучения генотипической резистентности к противовирусным препаратам [19, 20].

ВЫВОДЫ

Направлениями совершенствования лабораторной диагностики СЗГВИ в МО РФ могут являться:

- оптимизация логистики преаналитического этапа диагностики с расширением спектра валидированных методов консервации и доставки проб в лаборатории (в т. ч. «сухой капли»);
- сокращение длительности аналитического этапа диагностики путем более широкого клинического использования ЭТ и ПЦР (включая изотермический вариант);
- повышение чувствительности и специфичности методов серологической и молекулярной диагностики;
- совершенствование методологии валидации и интерпретации результатов лабораторной диагностики при обеспечении военно-врачебной экспертизы военнослужащих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, алгоритмы диагностики СЗГВИ нуждаются в пересмотре в пользу подтверждающих методов, позволяющих с высокой скоростью

и прогностической ценностью результата устанавливать наличие инфекции в первом образце крови или ином биологическом субстрате, взятом у пациента, с целью повышения своевременности лечебных и противоэпидемических мероприятий. Предлагается использование простых быстрых тестов с высокой чувствительностью и специфичностью в алгоритме диагностики, что позволит сократить ее длительность. Необходима валидация метода «сухой капли» для ИФА, ПЦР тест-систем отечественного производства с целью первичной диагностики и ДДН. Целесообразно внедрение тест-систем, позволяющих определить сроки инфицирования, особенно в случаях с сомнительными результатами ИБ. Необходимо совершенствование нормативной базы по обследованию и регистрации ВИЧ-инфицированных. Очевидна необходимость определения юридического статуса лиц с незавершенной диагностикой ВИЧ-инфекции с целью своевременности противоэпидемических и лечебно-профилактических мероприятий и объективности статистического учета данной категории лиц, также требуется подготовка специалистов лабораторной службы по новым методам исследования и интерпретации их результатов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Улюкин И.М., Буланьков Ю.И., Болехан В.Н., и др. Проблемы лабораторного определения гемоконтактных инфекций // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2013. № 3 (43). С. 1–8.
2. Аминов Р.М., Кузин А.А., Зобов А.Е. Военная эпидемиология: современное состояние и перспективы развития // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2019. Т. 38, № 4. С. 89–92. DOI: 10.17816/rmmar26027
3. Буланьков Ю.И., Булыгин М.А., Жданов К.В., и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции у военнослужащих Минобороны России как обоснование направлений оптимизации медицинской помощи военнослужащим // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2020. № 2 (4). С. 32–42. DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-4-32-42
4. Ульянова Я.С., Краснова Е.И., Проворова В.В., и др. Клинико-лабораторные проявления и сложности диагностики острой ВИЧ-инфекции у взрослых // Лечащий врач. 2019. № 9. С. 70–73.
5. Киреев Д.Е., Шипулин Г.А., Семенов А.В., и др. Сравнительная оценка тест-систем ИФА/ИХЛА 4-го поколения, применяемых в российской федерации для диагностики ВИЧ-инфекции // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2019. № 11 (2). С. 103–113.
6. Загрядская Ю.Е., Обрядина А.П. Современные подходы к диагностике ранней и длительно текущей ВИЧ-инфекции // Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний 2016. № 1 (16). С. 8–12.
7. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Кириченко А.А., и др. Сравнительный анализ диагностических наборов для количественного определения РНК ВИЧ-1, производимых в России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2020. № 12 (1). С. 123–133. DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-1-123-133
8. Загрядская Ю.Е., Обрядина А.П. Клинические аспекты лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции // Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний. 2016. № 1 (16). С. 12–15.

9. Branson B., Owen M., Bennett B., et al. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations. 2014.
10. Тыргина Т.В., Максимова А.Г., Буланьков Ю.И., Волокобинская Т.В. Оценка эффективности метода определения активности обратной транскриптазы ВИЧ с использованием тест-системы Exavir Load V.3 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2011. Т. 3, № 4. С. 67–71.
11. Нешумаев Д.А., Мейрманова Е.М., Кунцевич О.Н., и др. Определение ранней ВИЧ-инфекции в популяции по частоте встречаемости p24 антигена и в исследовании на давность заражения. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2020. № 12 (1). С. 68–74. DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-1-68-74
12. Kireev D.E., Chulanov V.P., Shipulin G.A., et al. Serological diagnosis and prevalence of HIV-1 infection in Russian metropolitan areas // BMC Infect. Dis. 2021. Vol. 21, No. 1. P. 24; DOI: 10.1186/s12879-020-05695-z
13. Загрядская Ю.Е., Нешумаев Д.А., Кокотюха Ю.А., и др. Оценка новой тест-системы ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК для определения вероятных сроков заражения вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20, № 3. С. 23–27. DOI: 10.17816/eid40863
14. Семенов А.В., Останкова Ю.В. Окультный (скрытый) гепатит В: проблемы лабораторной диагностики // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 8, № 3. С. 60–69. DOI: 10.24411/2305-34962019-13010
15. Габдрахманов И.А., Козлов К.В., Сукачев В.С., и др. Взаимосвязь ковалентно-замкнутой кольцевидной дезоксирибонуклеиновой кислоты и клинико-вирусологических показателей у больных хроническим вирусным гепатитом В // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2016. № 1 (53). С. 234–240.
16. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64, № 9. С. 565–570. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570
17. Буланьков Ю.И., Орлова Е.С., Лебедева Н.Г., и др. Сохранность антител к ВИЧ в сыворотке крови при использовании метода «сухой капли». В сб.: Актуальные проблемы трансфузиологии. Материалы научно-практической конференции, СПб., 7 октября 2011 г. СПб., 2011. С. 14.
18. Гавриш И.В. Метод капиллярной сухой крови и его место в лаборатории ИФА СПИД Центра // Медицина. 2012. № 2. С. 84–86.
19. Зубик А.Н., Рудницкая Г.Е., Евстапов А.А. Изотермическая петлевая амплификация LAMP в формате микроустройств (Обзор) // Научное приборостроение. 2021. Т. 31, № 1. С. 3–43.
20. Киселева Я.Ю., Птицин К.Г., Радько С.П., и др. Цифровая капиллярная ПЦР — перспективный технологический подход к количественному профилированию микроРНК // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62, № 4. С. 403–410.

REFERENCES

1. Ulyukin IM, Bulan'kov Yul, Bolekhan VN, et al. Challenges of Laboratory Distinction Blood Transmitted Infections. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2013;3(43):1–8. (In Russ.)
2. Aminev RM, Kuzin AA, Zobov AE. Military Epidemiology: Current State and Development Prospects. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2019;38(4): 89–92. (In Russ.) DOI: 10.17816/rmmar26027
3. Bulan'kov Yul, Bulygin MA, Zhdanov KV, et al. Clinical and epidemiological characteristics of HIV-positive servicemen in Russian Ministry of Defence as justification for directions of optimizing the medical care to servicemen. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2020;(2(4)):32–42. (In Russ.) DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-4-32-42
4. Ulyanova YaS, Krasnova EI, Provorova VV, et al. Clinical manifestations and challenges of diagnostics of acute HIV infection in adults. *Lechashchiy vrach*. 2019;(9):70–73. (In Russ.)
5. Kireev DE, Shipulin GA, Semenov AV, et al. Comparative Evaluation of the 4th Generation ELISA/CLIA assays used for the Diagnosis of HIV Infection in the Russian Federation. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2019;(11(2)):103–113. (In Russ.) DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-103-113
6. Zagryadskaya YuE, Obryadina AP. Modern approaches to the diagnosis of early and long-term HIV infection. *Laboratornaya diagnostika infektsionnykh zaboolevaniy*. 2016;(1(16)):8–12. (In Russ.)
7. Lapovok IA, Lopatukhin AE, Kirichenko AA, et al. Comparative analysis of diagnostic kits for the quantitative determination of HIV-1 RNA produced in Russia. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2020;(12(1)):123–133. (In Russ.) DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-1-123-133
8. Zagryadskaya YuE, Obryadina AP. Clinical aspects of laboratory diagnosis of HIV infection. *Laboratornaya diagnostika infektsionnykh zaboolevaniy*. 2016;1(16):12–15. (In Russ.)
9. Branson B, Owen M, Bennett B, et al. *Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations*. 2014.
10. Tyrgina TV, Maksimova AG, Bulan'kov Yul, Volokobinskaya TV. Evaluation of method of determining the activity of HIV reverse transcriptase using test-sistemy Exavir Load V.3. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2011;3(4):67–71. (In Russ.)
11. Neshumaev DA, Meyrmanova EM, Kuncovich ON, et al. Estimates of recent HIV infection in populacion by frequency of occurrence p24 antigen and in the kit distinguish recent from longstanding infection. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2020;(12(1)):68–74. (In Russ.) DOI: 10.22328/2077-9828-2020-12-1-68-74
12. Kireev DE, Chulanov VP, Shipulin GA, et al. // Serological diagnosis and prevalence of HIV-1 infection in Russian metropolitan areas. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):24; DOI: 10.1186/s12879-020-05695-z
13. Zagryadskaya YuE, Neshumaev DA, Kokotyukha YuA, et al. Assessment of a new "DS-EIA-HIV-AB-TERM" assay to determine the probable time of infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2015;20(3):23–27. (In Russ.) DOI: 10.17816/eid40863
14. Semenov AV, Ostanokova YuV. Occult (latent) hepatitis B virus: problems of laboratory diagnostics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2019;8(3):60–69. (In Russ.) DOI: 10.24411/2305-34962019-13010
15. Gabdrakhmanov IA, Kozlov KV, Sukachev VS, et al. Connection between covalently closed circular deoxyribonucleic acid and both clinical and virological indicators in patients with chronic viral hepatitis B. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2016;(1(53)):234–240. (In Russ.)

16. Ostankova YuV, Semenov AV, Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019;64(9):565–570 (In Russ.) DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-9-565-570

17. Bulan'kov Yul, Orlova ES, Lebedeva NG, et al. Preservation of antibodies to HIV in blood serum using the "dry drop" method. In: *Aktual'nyye problemy transfuziologii* (Actual problems of Transfusiology). Materials of the scientific and practical conference, St. Petersburg, October 7, 2011. St. Petersburg; 2011. P. 14. (In Russ.)

18. Gavrish IV. The method of capillary dry blood and its place in the laboratory of the ELISA AIDS Center. *Medicine*. 2012;(2):84–86. (In Russ.)

19. Zubik AN, Rudnitskaya GE, Evstrapov AA. LOOP-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in microdevice format (review). *Nauchnoe priboroostroeniye*. 2021;31(1):3–43. (In Russ.)

20. Kiseleva YaYu, Ptitsyn KG, Radko SP, et al. Digital droplet PCR — a prospective technological approach to quantitative profiling of microRNA. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016;62(4):403–410. (In Russ.) DOI: 10.18097/pbmc20166204403

ОБ АВТОРАХ

***Елена Станиславовна Орлова**, канд. мед. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (регистр инфекционной патологии и ВИЧ-инфицированных военнослужащих) научно-исследовательского отдела (Всеармейский медицинский регистр МО РФ) научно-исследовательского центра; адрес: Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1586-6635>; Scopus Author ID: 35178068800; eLibrary SPIN: 9424-9235; Author ID: 879889; Researcher ID: AAZ-1271-2021; e-mail: oes17@yandex.ru

Юрий Иванович Буланков, докт. мед. наук, доцент, Врио начальника центра клинической лабораторной диагностики; Scopus Author ID: 6506525191; Author ID: 698830; Researcher ID: AAM-6084-2021; e-mail: dr.bulankov@mail.ru

Алексей Александрович Сечин, майор мед. службы, начальник научно-исследовательской лаборатории научно-исследовательского отдела (Всеармейский медицинский регистр МО РФ) научно-исследовательского центра; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6832-6988>; eLibrary SPIN: 5002-8222; Researcher ID: GRS-2470-2022; e-mail: sechinalex@rambler.ru

AUTHORS' INFO

***Elena S. Orlova**, M.D., Ph.D. (Medicine), Research Associate of the Research Laboratory (register of infectious diseases and HIV-infected servicemen) of the Research Department (all-Army Medical Register of the Ministry of Defense of the Russian Federation) of the Research Center; address: 6, Akademika Lebedeva str., Saint Peterburg, 194044, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1586-6635>; Scopus Author ID: 35178068800; eLibrary SPIN: 9424-9235; Author ID: 879889; Researcher ID: AAZ-1271-2021; e-mail: oes17@yandex.ru

Yuriy I. Bulan'kov, M.D., D.Sc. (Medicine), Associate Professor, the Acting Head of the Center for Clinical Laboratory Diagnostics; Scopus Author ID: 6506525191; Author ID: 698830; Researcher ID: AAM-6084-2021; e-mail: dr.bulankov@mail.ru

Aleksey A. Sechin, M.D., major medical service, the Head of research laboratory of the Research Department (all-Army Medical Register of the Ministry of Defense of the Russian Federation) of the Research Center; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6832-6988>; eLibrary SPIN: 5002-8222; Researcher ID: GRS-2470-2022; e-mail: sechinalex@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author