

ОГЛЯДОВІ СТАТТІ

УДК: 616-053.32:658.512:615.7

Н. В. КотоваОдеський національний медичний
університет МОЗ України
(Україна, м.Одеса)ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ СУХОЇ
КРАПЛІ КРОВІ ДЛЯ РАННЬОЇ ДІАГНОСТИКИ
ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ У НЕМОВЛЯТ В РОДОПОМІЧНИХ
ЗАКЛАДАХ ТА НА РІВНІ ПЕРВИННОЇ
МЕДИКО-САНІТАРНОЇ ДОПОМОГИ**Ключові слова:** ВІЛ-інфекція,
немовляти, рання діагностика, суха
крапля крові.**Резюме.** В огляді літератури наведено порівняльний аналіз
переваг і недоліків використання сухої краплі крові для ранньої
діагностики ВІЛ-інфекції у немовлят.**Вступ**

Актуальність питання ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, в Україні зумовлена поширенням епідемії – у п'яти регіонах країни більш, ніж 1% вагітних інфіковані ВІЛ. Збільшення питомої ваги гетеросексуального шляху передачі ВІЛ та кількості ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку сприяє поступовому збільшенню кількості дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями. Таких дітей щорічно народжується в Україні близько 4000 [2].

У дітей раннього віку, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, встановити діагноз ВІЛ-інфекції серологічними методами – на підставі виявлення в крові антитіл до ВІЛ методом імуноферментного аналізу (ІФА) з підтвердженням позитивних результатів імунним блотом (ІБ), або іншою тест-системою ІФА – неможливо, що зумовлено наявністю в сироватці їх крові материнських антитіл – імуноглобулінів класу G (Ig G), що передаються внутрішньоутробно плоду через плаценту. В перші 9-18 місяців життя в крові у всіх дітей, народжених ВІЛ – інфікованими матерями, при обстеженні методом ІФА та ІБ виявляють позитивні результати, тим часом як дійсно інфікованими є лише 2-31% дітей. Ймовірність елімінації материнських антитіл до ВІЛ із крові неінфікованих дітей у віці 12 міс сягає 44–93%, у віці 18 міс – 88-100% [1, 11, 36]. Тобто, дітям, народженим ВІЛ-інфікованими матерями,

діагноз ВІЛ-інфекції серологічними методами можна встановити тільки у віці після 18 місяців, а виключити діагноз ВІЛ-інфекції на підставі негативних результатів тестів на антитіла до ВІЛ можна у віці після 9-18 місяців.

Рання діагностика ВІЛ-інфекції у дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, здійснюється за допомогою виявлення генетичного матеріалу ВІЛ. Провірусну ДНК або РНК вірусу виявляють методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Провірусну ДНК виявляють якісно у клітинах крові. РНК ВІЛ виявляють якісно та кількісно у плазмі крові [16, 62]. До вірусологічних методів ранньої діагностики ВІЛ-інфекції також відносять метод ІФА (ELISA) для виявлення антигену ВІЛ – р24 у плазмі крові. У світовій практиці цей тест використовують значно рідше, ніж визначення генетичного матеріалу ВІЛ методом ПЛР, тому що у дітей перших 4-6 тижнів життя він дає значно більше хибно позитивних реакцій, що зумовлено зв'язком антигену р24 ВІЛ-інфікованої дитини з антитілами матері. В останні часи з'явився ультра чутливий тест на антиген р24 та доведена можливість його використання для ранньої діагностики ВІЛ, що вивчається [19].

Доцільність ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей, перинатально інфікованих ВІЛ зумовлена тим, що без своєчасного початку антиретровірусної (АРВ) терапії до 1 року помирає 20-35% хворих на ВІЛ дітей, а до 2 років – половина з них [19]. Ранній початок АРВ-терапії зберігає ВІЛ-

інфікованим дітям здоров'я та життя. Доведено, що початок АРВ-терапії перинатально інфікованих ВІЛ дітей у віці до 3-х місяців значно знижує прогресування ВІЛ-інфекції до стадії СНІДу та смертність, що пов'язана з імунodefіцитом [14]. У немовлят, які починали приймати АРВ-терапію у віці до 3-х місяців, спостерігалось більш стійке та тривале зниження вірусного навантаження, ніж у дітей, які починали специфічне лікування у віці після 3-х місяців [6]. Рання діагностика ВІЛ-інфекції та ранній початок АРВ-терапії знижують ризик смерті на 76%, зменшують частоту тяжких проявів ВІЛ-інфекції на 75%, тобто зберігають життя та здоров'я ВІЛ-інфікованим дітям. Рання діагностика захворювання покращує спостереження за ВІЛ-інфікованими дітьми, економить ресурси на лікування опортуністичних інфекцій [10].

Раннє виключення діагнозу ВІЛ-інфекції має психологічні переваги для сім'ї; зменшує ризик стигми та дискримінації дітей, у тому числі, для дітей-сиріт збільшує шанс бути усиновленими; оптимізує медичне ведення неінфікованих дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями – дає можливість рано відмінити профілактику пневмоцистної пневмонії котримоксазолом, вакцинувати їх проти туберкульозу, що дуже важливо, враховуючи поширеність цього захворювання серед ВІЛ-інфікованих дорослих. Раннє уточнення ВІЛ-статусу дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, дає можливість швидко оцінити ефективність програм профілактики передачі ВІЛ від матері до дитини та посилити контроль за їх виконанням [11, 13, 36].

При дотриманні стандартів збирання зразків крові та технології проведення досліджень кількість хибно позитивних і хибно негативних результатів тестування на ВІЛ залежать від чутливості та специфічності тест-систем до субтипів вірусу, що циркулює у популяції, яку досліджують. ВООЗ рекомендує використовувати вірусологічні тести для діагностики ВІЛ-інфекції, що при дотриманні лабораторних стандартів мають мінімальну діагностичну чутливість (ДЧ) 95% (в ідеалі – 98%) і діагностичну специфічність (ДС) 98%. «Технічні» причини хибно позитивних результатів зумовлені високою чутливістю тестів і виникають в наслідок контамінації біологічних зразків, частіше на доаналітичному етапі. Хибно негативні результати частіше є наслідком порушення умов зберігання та транспортування біологічних зразків [11, 36].

Абсолютна кількість хибно позитивних та хибно негативних результатів зумовлена поширеністю ВІЛ-інфекції серед осіб, яких обстежують. Наприклад, якщо у вірусологічному тесту ДЧ

95% і ДС 98%, то за умови поширеності ВІЛ-інфекції 5% серед 10 000 дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями (500 – ВІЛ-інфіковані, 9 500 – не інфіковані ВІЛ), яких обстежують, позитивні результати будуть виявлені у 665 випадках (475 – дійсно позитивні, 190 – хибно позитивні); негативні результати – у 9335 випадках (9310 – дійсно негативні, 25 – хибно негативні). У такому випадку при першому тестуванні прогностична цінність позитивного результату дорівнює 71,4%, прогностична цінність негативного результату – 99,7%. У такому разі при однократному тестуванні 25 дітей з хибно негативними результатами у зв'язку з не своєчасним початком лікування мають високий ризик смерті, а 190 дітей з хибно позитивними результатами можуть без підстав отримати АРВ-терапію, що буде шкідливим для їх здоров'я та економічно не вигідно. Друге тестування тим самим тестом дає можливість з високим ступенем вірогідності встановити діагноз ВІЛ-інфекції: прогностична цінність другого позитивного результату дорівнює 99,2%, прогностична цінність другого негативного результату – 88,7%. Слід зазначити, чим нижче поширеність ВІЛ-інфікованих у популяції, що обстежують на ВІЛ, тим нижче прогностична цінність першого результату тесту. Так, при зниженні рівня перинатальної трансмісії ВІЛ до 2% прогностична цінність першого позитивного результату тесту на ВІЛ дитини, народженої ВІЛ-інфікованою матір'ю, знижується до 50,3%; при цьому прогностична цінність другого позитивного результату дорівнює 98,0% [11, 36]. Тобто, для раннього встановлення діагнозу ВІЛ-інфекції дитині, народженої ВІЛ-інфікованою матір'ю, необхідно отримати два позитивних результати вірусологічного тесту на ВІЛ.

Перше принципове питання ранньої діагностики на ВІЛ-інфекцію – коли вперше тестувати дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, за допомогою вірусологічних методів: на першому тижні життя або у віці 4-6 тижнів життя. ВООЗ наполегливо рекомендує проводити перше тестування дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, вірусологічними методами у віці 4-6 тижнів або якомога раніше при появі можливості [11, 36].

Відомо, що навіть за умов штучного вигодування дитина може інфікуватися ВІЛ від матері внутрішньоутробно або у пологах. Про внутрішньоутробне інфікування дитини ВІЛ свідчить позитивний результат тесту на наявність генетичного матеріалу ВІЛ методом ПЛР у перші 48 год. після народження. Негативний результат тесту на першому тижні життя та позитивний результат, що отримано у віці після першого тижня життя, свід-

чить про інфікування у пологах. За умови відсутності перинатальної профілактики передачі ВІЛ ймовірність внутрішньоутробного інфікування дорівнює 27-35%, а ймовірність інфікування у пологах сягає 65% [24, 29]. Дослідження, проведені у 90-ті роки ХХ сторіччя продемонстрували, що при тестуванні методом ПЛР крові дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, на наявність провірусної ДНК ВІЛ у перші 48 год. ДЧ вірусологічних методів дорівнює 38% (95% ДІ 29-46%). Протягом першого тижня життя ДЧ дослідження підвищується несуттєво. На другому тижні життя ДЧ методу зростає і у віці 14 днів сягає 93% (95% ДІ 76-97%). У віці 28 днів ДЧ дослідження провірусної ДНК сягає 96%, ДС дорівнює 99% [55]. Подальші дослідження в США встановили, що в 1990-1992 роках, коли перинатальна трансмісія ВІЛ дорівнювала 18,1%, рівень внутрішньоутробного інфікування сягав 27%; а в 1999-2000 роках в результаті впровадження комплексу перинатальної профілактики передачі ВІЛ на фоні зниження рівню перинатальної трансмісії ВІЛ до 1,6%, частка дітей, інфікованих ВІЛ внутрішньоутробно, зросла до 80,0% [29]. В Україні у 2002-2004 роках у дітей на першому тижні життя виявлено ДЧ дослідження провірусної ДНК тест-системою «Амплісенс ДНК ВІЛ» 87,0% (95% ДІ 73-100%) [4]. Тобто, при проведенні перинатальної профілактики передачі ВІЛ відносна частка дітей, інфікованих у пологах зменшується, а відносна частка дітей, інфікованих внутрішньоутробно зростає. З цього виходить, що при успішній дії програм профілактики передачі ВІЛ від матері до дитини все більш інформативним стає обстеження на ВІЛ дітей на першому тижні життя.

Доведено, що внутрішньоутробне інфікування дітей ВІЛ характеризується більш високим вірусним навантаженням в крові, більш тяжким природним перебігом ВІЛ-інфекції. В таких дітей раніше, ніж у дітей інфікованих ВІЛ у пологах, з'являються симптоми ВІЛ-інфекції та тяжкого імунodefіциту, раніше настає смерть. Для запобігання несприятливих наслідків, зниження смертності в результаті тяжкого імунodefіциту всі вони потребують більш раннього початку АРВ-терапії. Тобто діти з внутрішньоутробним інфікуванням ВІЛ в першу чергу потребують ранньої діагностики захворювання для негайного початку АРВ-терапії [5, 29]. Так, наприклад, у США перше тестування на ВІЛ дитині проводять у перші 2 тижні життя [28].

Інші важливі питання ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у немовлят – які вірусологічні тести і які технології збирання крові слід використовувати? ВООЗ наполегливо рекомендує

використовувати наступні вірусологічні тести для першого тестування з метою ранньої діагностики ВІЛ-інфекції:

- 1) якісне визначення провірусної ДНК ВІЛ у цільній крові або у сухий краплині крові (СКК);
- 2) якісне визначення РНК ВІЛ у плазмі крові або у СКК;
- 3) ультраточливий тест на антиген р24 у плазмі крові або СКК [36].

Провірусну ДНК якісно визначають методом ПЛР у клітинах крові – мононуклеарах. Це – один з найбільш поширених та найбільш чутливих тестів для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей, які мають перинатальний контакт з ВІЛ. Він надійно виявляє інфікування ВІЛ як за умови відсутності АРВ-профілактики або АРВ-терапії, що отримують мати та/або немовля, так і у випадках перинатальної дії АРВ-препаратів. Цей метод дозволяє виявляти ВІЛ в уражених клітинах навіть у випадках, коли в результаті АРВ-терапії у ВІЛ-інфікованої людини вірусне навантаження у плазмі крові не визначається. Існуючі тест-системи мають достатньо високу ДЧ для виявлення різних субтипів ВІЛ, у тому числі, В, С, D, Е, Г і Н [23, 32].

Для якісного визначення провірусної ДНК методом ПЛР кров з вени дитини натщесерце набирають у пробірки з 1/10 об'єму антикоагулянту – 3% розчину ЕДТА. Щоб уникнути руйнування клітин, зразок крові в лабораторію транспортують при температурі +2...+8°С. Від моменту взяття крові до її надходження в лабораторію не повинно пройти більше 24-48 годин [3].

РНК ВІЛ виявляють у плазмі крові, а також у зразках СКК або краплі плазми крові на фільтрувальному папері, користуючись різноманітними методами дослідження. Більшість методів визначають «вірусне навантаження» – кількість РНК ВІЛ в 1 мл плазми крові, що використовують для моніторингу прогресування ВІЛ-інфекції та контролю ефективності АРВ-терапії. Існують наступні методи виявлення РНК ВІЛ: Real-time-ПЛР, В-DNA, transcription-mediated amplification (ТМА) і Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Якісне визначення РНК ВІЛ методом ТМА та деякі з інших методів можуть використовуватись як альтернатива для раннього діагностики ВІЛ-інфекції [11, 36]. Кров для дослідження РНК ВІЛ забирають у пацієнтів уранці натщесерце в пробірку з 3% розчином ЕДТА. Для отримання плазми цільну кров центрифугують при 800-1600 г впродовж 20 хвилин. Плазму піддають глибокому заморожуванню і зберігають у замороженому вигляді до проведення аналізу.

У 90-х роках ХХ сторіччя були отримані дані, що методи виявлення РНК ВІЛ в плазмі на пер-

ших тижнях життя демонструють рівну, а іноді й більш високу ДЧ, ніж методи виявлення провірусної ДНК [22]. Проте відомо, що під дією АРВ-препаратів вірусне навантаження у плазмі крові знижується і може не визначатись (рівень нижче, ніж чутливість тест-системи; наприклад, нижче 40 копій/мл). Тому виникали сумніви в надійності методу визначення РНК ВІЛ для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей на фоні проведення перинатальної АРВ-профілактики передачі ВІЛ. Низка досліджень не виявила значного зниження ДЧ методу у ВІЛ-інфікованих дітей, які зазнали дії АРВ-препаратів [27]. Проте слід зазначити, якщо дитина отримує АРВ-препарати на момент взяття крові та в неї є вірусне навантаження, що не визначається, це не виключає інфікування ВІЛ [18]. Тобто, хоча у ВІЛ-інфікованих дітей перших місяців життя, як правило, дуже високе вірусне навантаження (значно більш високе, ніж у дорослих), щоб виключити мінімальну можливість помилок у немовлят, які зазнали профілактичної дії АРВ-препаратів, у якості першого тесту для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції частіше визначають провірусну ДНК. Методику кількісного визначення РНК ВІЛ доречно використовувати як другий, той що підтверджує, вірусологічний тест. Поряд з підтвердженням факту інфікування ВІЛ цей тест надасть важливу інформацію про рівень вірусного навантаження в плазмі ВІЛ-інфікованої дитини, що дозволить оцінити ризик прогресування захворювання та ризик смерті [26, 36].

Слід зазначити, якщо ВІЛ-інфікована мати годує свою дитину грудьми, інфікування може відбутися у будь-який час. Тому позитивний результат вірусологічного дослідження на фоні грудного вигодовування вказує на інфікування ВІЛ, а негативний результат не виключає наявності захворювання. Остаточне виключення діагнозу ВІЛ-інфекції доцільно проводити через 6 тижнів після закінчення грудного вигодовування [36].

Згідно наполегливих рекомендацій ВООЗ, якщо перший результат вірусологічного тесту позитивний, АРВ-терапію слід починати негайно, не очікуючи другого результату. Одночасно у дитини набирають біологічний матеріал (кров або плазму) і направляють його для проведення другого вірусологічного дослідження, що підтвердить перший результат. Результат вірусологічного обстеження немовляти слід повідомляти в клініку, а також матері або особі, яка доглядає дитину, як можна швидше – не пізніше, ніж через 4 тижні після забору крові, для забезпечення своєчасного початку АРВ-терапії. Якщо перший результат вірусологічного тесту був позитив-

ним, а другий – негативним, необхідно провести третє дослідження. Дослідження нового зразка біологічного матеріалу тим самим методом, як і попередні, може пояснити причини отримання хибного результату – контамінацію, порушення умов збирання, транспортування, зберігання зразків, процедури аналізу. Повторне дослідження першого та другого зразків біологічного матеріалу не виключає ті ж самі помилки, що вже мали місце бути [36].

Виключення діагнозу ВІЛ-інфекції здійснюється на підставі отримання 2 негативних результатів вірусологічних тестів (один з яких отримано у дитини у віці після 2 тижнів, а другий – у віці після 4-6 тижнів життя, або на підставі отримання 2 негативних серологічних тестів у віці 6-18 місяців, або 1 негативного результату серологічного тесту у віці після 18 місяців [28, 36].

Зразки СКК можна використовувати для дослідження провірусної ДНК, РНК ВІЛ та антигену р 24 [16, 36]. У багатьох дослідженнях порівнювали ДЧ і ДС різних методик визначення генетичного матеріалу ВІЛ у цільній крові та у зразках СКК. Проведені дослідження продемонстрували високу ДЧ і ДС тестування СКК і довели можливість використання СКК для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей [23, 25, 30]. Виявлення провірусної ДНК методом ПЛР із зразків СКК демонструє таку ж саму ДЧ і ДС, як з цільної крові [26]. Зіставлення методів дослідження провірусної ДНК і РНК ВІЛ у СКК продемонструвало їх однаково високу ДЧ (96-100%) і ДС (100%) [12]. Зіставлення результатів ПЛР цільної крові (Ampligor ДЧ 94%, Multiplex ДЧ 100%, ДС 100%) і ПЛР зразку СКК (S&S IsoCode ДЧ 94%, Whatman ДЧ 89,4%, ДС 100%) продемонструвало однаково високу ДС та ДС методів у дітей у віці 2-6 місяців. Метод ПЛР дослідження РНК ВІЛ, що проведений з плазми, витягнутої з СКК (QL NASBA), продемонстрував ДЧ 89,7% і ДС 97,5% [12, 23, 25, 30, 34]. Проте є дані, що при використанні СКК у дітей з малою кількістю провірусної ДНК в крові, можуть бути хибно негативні результати [7]. Є потенційна можливість отримання негативного результату тесту на РНК ВІЛ з СКК у ВІЛ-інфікованих дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, на фоні профілактичного отримання АРВ-препаратів. Частіше нижня межа кількісного виявлення РНК ВІЛ для СКК дорівнює 3000-5000 копій/мл [11, 34, 36].

Збір крові новонароджених на фільтрувальний папір – технологія сухої краплі крові (СКК) використовується в світі вже більш 40 років. Вперше цю методику запропонував R. Guthrie у 1963 році для проведення скринінгу ново-

народжених на фенілкетонурію. Із зразка СКК можна визначити цілу низку біохімічних або генетичних маркерів: амінокислоти, ферменти, гормони, генетичний матеріал (ДНК, РНК), ліки, наркотики, тощо. Метод збирання зразків СКК визнаний, як найбільш зручний для проведення скринінгу – обстеження великої кількості осіб у централізованих лабораторіях, що віддалені від пацієнтів та потребують транспортування зразків. Метод СКК має суттєві переваги для обстеження новонароджених та дітей раннього віку, тому що береться малий об'єм крові, що не потребує пункції вени, є менш травматичним, тому більш прийнятним для матері [35].

Технологія збирання зразків СКК проста, зручна, але потребує навичок медичного персоналу, забезпечення картками фільтрувального паперу, спеціальних пристроїв для висушування зразків та витратних матеріалів для їх транспортування. Для отримання зразка СКК кров збирають з п'ятки або пальця дитини на спеціальний фільтрувальний папір, заповнюють кров'ю 5 плям (приблизно по 50 мкл) правильним чином – повністю виділений кружок на папері. Папір із зразками крові ретельно висушують при кімнатній температурі не менше 4-12 годин. При висушуванні зразка слід уникати його контакту з іншими фільтрувальними картками, запобігати дії сонячного світла та пилу. Сухі зразки відокремлюють один від одного тонким папером і упаковують у пластикові пакети зі спеціальною зір-застібкою разом із спеціальним осушувачем та індикатором вологості. Пакет може транспортуватися у лабораторію при кімнатній температурі на протязі 2 тижнів (можливе транспортування кур'єром або поштою). В один пакет може бути упаковано 10 проб (10 осушувачів та 1 індикатор вологості). Висушені зразки крові на фільтрувальному папері можуть зберігатися при температурі +2...+8°C впродовж 6 тижнів (можливо й більше). В лабораторії проводиться додаткова підготовка зразка для дослідження – виділення біологічного матеріалу з фільтрувального паперу для його тестування, що потребує спеціального устаткування (ножиці або компостери) [3, 35].

Можливість збирати кров з п'ятки, виключення пункції вени у дітей раннього віку зменшує ризик контакту медичного персоналу з біологічною рідиною, що містить ВІЛ, зменшує ризик аварій на робочому місці. На відміну від транспортування в централізовану лабораторію пробірок з кров'ю, транспортування сухих зразків крові та є безпечним, повністю виключає ризик аварії та контакту з біологічною рідиною при транспортуванні. Транспортування та зберігання зразків СКК не вимагає

холодового ланцюга; зразки СКК не потребують термінової доставки в лабораторію [20].

Вивчалися умови та термін зберігання зібраних зразків СКК для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції, визначення вірусного навантаження та генетичної резистентності ВІЛ. Провірусна ДНК стабільно виявляється в зразках СКК, що зберігалися при кімнатній температурі впродовж 9 місяців. Проте є дані, що вірусне навантаження після 1-3 місяців зберігання зразків при кімнатній температурі знижувалося [8]. На відміну від цього, в іншому мультицентровому дослідженні, що проведено у Північній Америці, встановлено стійкий рівень РНК ВІЛ в зразках СКК, які зберігалися при кімнатній температурі щонайменше впродовж 1 року. Екстремальне зберігання зразків СКК при температурі 37°C й вологості 100% призвело до швидкого (за 2 тижня) пошкодження зразків, що спричинило неможливість провести дослідження генотипичної резистентності вірусу [20].

Витрати на збирання СКК є меншими, ніж цільної крові; транспортні витрати помітно менші, порівняно з транспортуванням пробірок з кров'ю або плазмою. При цьому фактичні витрати на процес тестування в лабораторії залишаються незмінними, але для проведення аналізу з СКК необхідний додатковий час для виділення зразка та проведення екстракції біологічного матеріалу [15, 21]. Результати дослідження методом ПЛР зразка СКК можна посилати поштою, електронною поштою, кур'єром. Позитивні результати можна негайно повідомляти по телефону, що скорочує час для повідомлення. Враховуючи, що результати досліджень повідомляються у лікувальний заклад за місцем проживання дитини, зменшується кількість дітей, що втрачаються з-під медичного спостереження [9].

Використання для дослідження методом ПЛР зразків СКК дає можливість здійснювати ранню діагностику ВІЛ-інфекції у пологових будинках та на первинному рівні медико-санітарної допомоги, що децентралізує не тільки забір крові, але й медичну допомогу дітям, народженим ВІЛ-інфікованими матерями, збільшує можливість доступу таких дітей до ранньої діагностики ВІЛ-інфекції та лікування. Своєчасне призначення АРВ-терапії ВІЛ-інфікованим дітям, у свою чергу, є ключовим моментом для збереження здоров'я та зниження смертності хворих на ВІЛ-інфекцію дітей [9, 10, 31].

Зручність збирання крові, необхідність малого об'єму крові, що не потребує пункції вени у дитини раннього віку, зниження вартості збирання та транспортування зразків до центральної лабораторії, децентралізація медичної допомоги дітям,

народженим ВІЛ-інфікованими матерями, дозволило багатьом країнам з обмеженими економічними ресурсами стандартизувати вірусологічне тестування на ВІЛ з СКК, впровадити його та, тим самим, покращити охоплення дітей з метою ранньої діагностики ВІЛ-інфекції та своєчасного призначення АРВ-терапії [9, 10, 31, 36].

Таким чином, огляд джерел літератури продемонстрував, що дослідження генетичного матеріалу ВІЛ методом ПЛР для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей із зразків СКК у порівнянні з дослідженням цільної крові при рівній ДЧ та ДС має суттєві переваги: зручність і безпека збирання крові, необхідність малого об'єму крові, що не потребує пункції вени у дитини, низька вартість збирання, легкість та безпека транспортування зразків в централізовану лабораторію, не потребує холодового ланцюга. Недоліки дослідження СКК у порівнянні з дослідженням цільної крові наступні: потребує додаткового етапу обробки зразку в лабораторії та додаткового обладнання для цього, навчання більшої кількості медичного персоналу збиранню зразків СКК.

Простота збирання СКК дає можливість здійснювати ранню діагностику ВІЛ-інфекції у пологовому будинку та на рівні первинної медичної ланки. Тому впровадження СКК може стати важливим кроком до децентралізації медичної допомоги дітям, народженим ВІЛ-інфікованими матерями, значно розширює доступ дітей до ранньої діагностики ВІЛ-інфекції та своєчасного призначення лікування, що знизить інвалідність та смертність хворих на ВІЛ-інфекцію дітей, та витрати, цим зумовлені.

Разом з впровадженням СКК необхідно реформувати й ранню діагностику ВІЛ-інфекції в країні. На наш погляд, є декілька можливих шляхів розвитку ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей в Україні:

Варіант 1. Порядок і терміни ранньої діагностики залишаються дотеперішніми – в центрі профілактики та боротьби зі СНІДом збирають зразки СКК (1-й тест – у віці 1-2 міс, при негативному результаті 1-го тесту 2-й тест – в 3-4 міс, при дискордантному результаті – 3-й тест). Зразки СКК з центру профілактики та боротьби зі СНІДом відправляють на тестування в централізовану лабораторію для визначення провірусної ДНК методом ПЛР. Це «централізований» варіант, при якому основними перевагами СКК є простота забору крові та зручність транспортування. Найголовніший недолік – необхідність транспортування дитини в центр профілактики та боротьби зі СНІДом.

Варіант 2. Терміни діагностики залишаються дотеперішніми, збирання зразків СКК передається на первинний рівень, де кров набирають,

висушують, упаковують і відправляють в централізовану лабораторію. Основні переваги – «децентралізація» ранньої діагностики, «звільнення» центру профілактики та боротьби зі СНІДом від неінфікованих дітей, відсутність ризику хибно позитивних результатів на доаналітичному етапі. Недоліки – імовірність виникнення труднощів з постачанням витратних матеріалів на первинний рівень медичної допомоги, відсиленням зразків «по одному», тому що пацієнти географічно «розсіяні» по місцях проживання, відсутність навичок збирання зразків СКК у персоналу тощо.

Варіант 3. Ранню діагностику ВІЛ-інфекції починають у пологовому будинку: для 1-го тесту забирають кров дитини, народженої ВІЛ-інфікованою матір'ю, з п'ятки методом СКК на 2-4-й день життя дитини; подальше обстеження дитини на ВІЛ здійснюється в центрі профілактики та боротьби зі СНІДом згідно діючому алгоритму ранньої діагностики ВІЛ-інфекції. Такий варіант дає можливість виявляти дітей з високим ризиком летального виходу у перші місяці життя (діти, які інфікувалися ВІЛ внутрішньоутробно) і рано призначати їм АРВ-терапію. Дотестове консультування матері у пологовому будинку, її мотивування звернутися за результатом тесту до центру профілактики та боротьби зі СНІДом є додатковим фактором, що може реально підвищити охоплення дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями, ранньою ПЛР-діагностикою зі своєчасним початком АРВ-терапії. На користь цього варіанту використання методу також вказує те, що медичний персонал пологових будинків має певний досвід збирання СКК для неонатального скринінгу на фенілкетонурію та гіпотіреоз, тому впровадження методу не викликає труднощів. Недоліки – у частки ВІЛ-інфікованих дітей (які інфікувалися у пологах) перший результат буде істинно негативним, другий результат позитивним, тому буде необхідне третє тестування.

Висновки

1. Аналіз літературних джерел продемонстрував та підтвердив той факт, що метод СКК є перевіреним часом і багатьма дослідженнями – він демонструє однакову з цільною кров'ю діагностичну чутливість та специфічність; у порівнянні з цільною кров'ю є більш доступним для пацієнтів і економічним для системи охорони здоров'я країни, тому його доцільно впроваджувати в Україні.
2. Впровадження в системі охорони здоров'я України методу СКК доцільно проводити разом з переглядом алгоритму ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей з проведенням першого тестування у пологовому будинку, а далі – за ді-

ючим алгоритмом ранньої діагностики. Очікуваними результатами від такої зміни є: своєчасна рання діагностика ВІЛ-інфекції у дітей з антенатальним інфікуванням ВІЛ, своєчасний початок АРВ-терапії, зниження показників захворюваності, інвалідності та летальності ВІЛ-інфікованих дітей та витрат, цим зумовлених.

3. При успішному випробуванні методу СКК наступним кроком також може бути посту-

пова децентралізація забору крові шляхом залучення у процес збирання СКК діючих мобільних лабораторій, що існують у деяких центрах профілактики та боротьби зі СНІДом, кабінетів інфекційних захворювань за місцем проживання ВІЛ-інфікованих дітей, що реально наблизить можливості ранньої діагностики ВІЛ-інфекції до пацієнтів та підвищить охоплення ПЛР-тестуванням.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аряев М. Л. Зникнення материнських антитіл до ВІЛ у дітей раннього віку, народжених ВІЛ-інфікованими жінками / М. Л. Аряев, Н. В. Котова, О. О. Старець // Досягнення біології та медицини. – 2006. – № 2 (8). – С. 30-35.
2. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень. № 35. – Київ, 2011. – 64 с.
3. Инструкция по применению набора реагентов для выявления провирусной днк вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АМПЛИСЕНС® ДНК-ВИЧ-FL» Режим доступа: <http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/730/MANUAL-DNK-VICH-FL-RU.080411.pdf>. – Назва з екрану.
4. Котова Н. В. Діагностична цінність дослідження генетичного матеріалу ВІЛ методом полімеразної ланцюгової реакції у дітей народжених ВІН-інфікованими жінками / Н. В. Котова, О. О. Старець // Одеський медичний журнал. – 2006. – № 6 (98). – С. 38-41.
5. Старець О. О. Перебіг ВІЛ-інфекції у дітей з доведеним антенатальним інфікуванням ВІЛ / О. О. Старець, Н. В. Котова // Одеський медичний журнал. – 2010. – № 1 (117). – С. 64-66.
6. A trial of three antiretroviral regimens in HIV-1-infected children / K. Luzuriaga, M. McManus, L. Mofenson [et al.] PACTG 356 Investigators // – N. Engl. J. Med. – 2004. – N 350 (24). – P. 2471-2480.
7. Detection of Low Levels of Human Immunodeficiency Virus (HIV) May Be Critical for Early Diagnosis of Pediatric HIV Infection by Use of Dried Blood Spots / J. Walter, L. Kuhn, K. Semrau et al. // – J. Clin. Microbiology. – 2009. – N 47 (9). – P. 2989-2991
8. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Dried blood spots for the diagnosis and quantitation of HIV-1: stability studies and evaluation of sensitivity and specificity for the diagnosis of infant HIV-1 infection in Thailand / W. Leelawiwat, N. L. Young, T. Chaowanachan [et al.] // – J. Virol. Methods. – 2009. – N 155. – P. 109-117.
9. Dried blood spots improve access to HIV diagnosis and care for infants in low-resource settings / G. G. Sherman, G. Stevens, S. A. Jones [et al.] // J. AIDS. – 2005. – N 38 (5). – P. 615-617.
10. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants / CHER Study Team. A. Violari, M. F. Cotton [et al.] // – N. Engl. J. Med. – 2008. – N 359 (21). – P. 2233-2244.
11. Early detection of HIV infection in infants and children. Guidance note on the selection of technology for the early diagnosis of HIV in infants and children. Summary of recommendations. – WHO, May 2007.
12. Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtypes / N. L. Young [et al.] // – J. AIDS. – 2000. – N 24 (5). – P. 401-407.
13. Early infant HIV-1 diagnosis programs in resource limited settings: opportunities for improved outcomes and more cost-effective interventions / A. L. Ciaranello, J. – E. Park, L. Ramirez-Avila [et al.] // – BMC Medicine. – 2011.
14. Effect of Early Antiretroviral Therapy on the Risk of AIDS / Death in HIV-infected Infants / T. Goetghebuer, E. Haelterman, J. Le Chenadec [et al.] The European Infant Collaboration group // – AIDS. – 2009. – N 23 (5). – P. 597-604.
15. Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnostic laboratory / J. C. Patton, E. Akkers, A. H. Coovadia [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2007. – N. 14. – P. 201-203.
16. High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions / M. T. Alvarez-Munoz [et al.] // – Archives of Medical Research. – 2005. – № 36 (4). – P. 382-386.
17. Infants by Use of Dried Blood Spots and an Ultrasensitive p24 Antigen Assay / A. Cachafeiro, G. G. Sherman, A. H. Sohn [et al.] // J. of Clin. Microbiology. – 2009. – N 47 (2). – P. 459-462.
18. Influence of mother and infant zidovudine treatment duration on the age at which HIV infection can be detected by polymerase chain reaction in infants / Prasitwattanaseree S [et al.] // – Antiviral therapy. – 2004. – № 9 (2). – P. 179-185..
19. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis / M. L. Newell, H. Coovadia, M. Cortina-Borja [et al.] International AIDS Society (IAS) Working Group on HIV Infection in Women and Children // – Lancet. – 2004. – N 364 (9441). – P. 1236-1243.
20. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability / D. Brambilla, C. Jennings, G. Aldrovandi [et al.] // – J. Clin. Microbiol. – 2003. – N 41. – P. 1888-1893.
21. No evidence for crosscontamination of dried blood spots excised using an office hole-punch Leading article for HIV-1 drug resistance genotyping / A. J. Buckton, D. P. Prabhu, P. A. Cane [et al.] // – J. Antimicrob. Chemother. – 2009. – N 63. – P. 615-616.
22. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection / J. S. Lambert [et al.] // J. AIDS. – 2003. – N 34 (5). – P. 512-519.
23. Performance of a Novel Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Total Nucleic Acid-Based Real-Time PCR Assay Using Whole Blood and Dried Blood Spots for Diagnosis of HIV in Infants / W. Stevens, L. Erasmus, M. Moloi [et al.] // J. Clin. Microbiology. – 2008. – N 46 (12). – P. 3941-3945.
24. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1 // Y. J. Bryson, K. Luzuriaga, J. L. Sullivan, D. W. Wara // – N. Engl. J. Med. – 1992. – N 327 (17). – P. 1246-1247.
25. Qualitative Human Immunodeficiency Virus RNA Analysis of Dried Blood Spots for Diagnosis of Infections in Infants // R. J. S. Kerr [et al.] // – Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – N 47 (1). – P. 220-222
26. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay / N. Desire. [et al.] // – J. Clin. Microbiology. – 2001. – N 39 (4). – P. 1303-1310.
27. Quantitative RNA testing for diagnosis of HIV-infected infants / S. Nesheim [et al.] // J. AIDS. – 2003. – N 32 (2). – P. 192-195.
28. Read J. S. Diagnosis of HIV-1 infection in children younger than 18 months in the United States / J. S. Read // – Pediatrics. – 2007. – N 120 (6). – P. 1547-1562.
29. Risk Factors for In Utero and Intrapartum Transmission of HIV / L. S. Magder, L. Mofenson, E. Mary [et al.] // – J. AIDS. – 2005. – N 38 (1). – P. 87-95.

30. RNA versus DNA for early infant diagnosis of HIV-1 infection in Senegal (NucliSENS EasyQ (R) HIV-1 1.2 / Amplicor (R) HIV-1 DNA test 1.5) / K. Kébé, O. Ndiaye, H. D. Ndiaye [et al.] // – J. Clin. Microbiol. – 2011, May 4. [Epub ahead of print].
31. Role of the laboratory in ensuring global access to ARV treatment for HIV-infected children: consensus statement on the performance of laboratory assays for early infant diagnosis / W. Stevens, G. Sherman, R. Downing et al. // – Open AIDS J. – 2008. – N 2. – P. 17-25.
32. Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda / A. Fischer [et al.] // – J. Clin. Microbiology. – 2004. – N 42 (1). – P. 16-20.
33. The sensitivity of HIV-1 DNS polymerase chain reaction in the vertically transmitted human immunodeficiency virus infection / D. T. Dunn, C. D. Brandt, A. Krivine [et al.] // – J. Infect. Dis. – 1995. – N 9 (9). – P. 7-11.
34. Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection / S. Uttayamakul, S. Likanonsakul, R. Sunthornkachit [et al.] // – J. Virol. Methods. – 2005. – N 128 (1-2). – P. 128-134.
35. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens / J. V. Mei, J. R. Alexander, B. W. Adam [et al.] // – J. Nutr. – 2001. – N 131. – P. 1631S–1636S.
36. WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children. – WHO, 2010. – P. 56.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ
СУХОЙ КАПЛИ КРОВИ ДЛЯ РАННЕЙ
ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
У МЛАДЕНЦЕВ В РОДОВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
УЧРЕЖДЕНИЯХ И НА УРОВНЕ ПЕРВИЧНОЙ
МЕДИКО-САНИТАРНОЙ ПОМОЩИ**

Н. В. Котова

**Одесский национальный медицинский университет
МЗ Украины
(Украина, г. Одесса)**

Резюме. В обзоре литературы представлен сравнительный анализ основных преимуществ и недостатков использования сухой капли крови для ранней диагностики ВИЧ-инфекции у младенцев.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, младенцы, ранняя диагностика, сухая капля крови.

**USAGE OF THE DRIED BLOOD
SPOTS FOR EARLY DETECTION
OF HIV-INFECTED INFANTS
AT MATERNITY HOSPITALS AND PRIMARY
HEALTH CARE**

N. V. Kotova

**Odessa National Medical University
(Ukraine, Odessa,)**

Summary. The literature review shows the advantages and disadvantages of using of the dried blood spots for early diagnosis of HIV-infection in infants.

Key words: HIV-infection, infants, early diagnosis, dried blood spots.

Рецензент: Завідувач кафедри неонатології
Харківської медичної академії післядипломної освіти
д. м. н., професор Клименко Т.М