



МІНІСТЕРСТВО
ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я
УКРАЇНИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

щодо
лабораторного
моніторингу
за ВІЛ-інфекцією
та антиретровірусною
терапією

2004 рік

Доказованість: А. В.

Розробники:

Зав. клініко-діагностичної лабораторії Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського АМН України, Заслужений лікар України
Василенко Л.Г.

Науковий співробітник лаб.загальної вірусології Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім.Л.В.Громашевського АМН України
Кравченко О.М.

Науковий співробітник лаб.загальної вірусології Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім.Л.В.Громашевського АМН України
Льольчук М.Г.

Консультант:

д.м.н., професор
Щербінська А.М.

Рецензент:

д.м.н., професор
І.В.Дзюблік

Відповідальний редактор:

к.м.н. **Круглов Ю.В.,**
Філіпovich С.А.

Альянс
Міжнародний Альянс з ВІЛ/СНІД в Україні



Видано МБФ «Міжнародний Альянс з ВІЛ/СНІД в Україні» за фінансової підтримки Глобального фонду боротьби зі СНІД, туберкульозом та малярією в рамках угоди UKR-102-G04-H-00 від 15 березня 2004 року.

Протокол лабораторного моніторингу за ВІЛ-інфекцією та антиретровірусною терапією розроблено на основі «Scaling up Antiretroviral Therapy in Resource-Limited Setting». Guidelines for a public health approach. World Health Organization. June, 2002 «Consultation for the development of protocols for HIV care for Ukraine and other Commonwealth Independent States countries, WHO HQ, May 5-8, 2003».

Затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України № 580 від 12.12.2003 р. «Про удосконалення лікування хворих на ВІЛ-інфекцію та СНІД».

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ВСТУП | 5 |
| 1. Загальний стан проблеми | 6 |
| 2. Лабораторний моніторинг | 8 |
| 2.1. Діагностика вірусних інфекцій..... | 11 |
| 2.2. Діагностика інфекцій, викликаних бактеріями..... | 16 |
| 2.3. Інфекції, викликані найпростішими..... | 20 |
| 2.4. Діагностика грибкових інфекцій..... | 25 |
| 3. Лабораторний моніторинг за антиретровірусною терапією хворих на ВІЛ/СНІД | 33 |
| 3.1. Оцінка імунологічного стану..... | 35 |
| 3.2. Кількісний вміст РНК ВІЛ-1 в плазмі крові (вірусне навантаження)..... | 38 |
| 3.3. Визначення резистентності до антиретровірусних препаратів..... | 45 |
| 3.4. Діагностика ВІЛ-інфекції у дітей раннього віку..... | 48 |
| ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ | 51 |
| ДОДАТКИ | 53 |

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АЛТ – аланінамінотрансфераза
АРТ – антиретровірусна терапія
АСТ - аспаратамінотрансфераза
АА - латексаглютинація
ЛДГ - лактатдегідрогеназа
ВВАРТ – високоактивна антиретровірусна терапія
ВІЛ – вірус імунодефіциту людини
ВЕБ - вірус Епштейна-Барр
ВН – вірусне навантаження
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
ВПГ - вірус простого герпесу
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ІФА – реакція імуноферментного аналізу
МФА – метод флюоресцентних антитіл
НІЗІ – нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази
ННІЗТ – нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази
ЛПУ – лікувально-профілактична установа
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
РЗК – реакція зв'язування комплексу
РНГА – реакція непрямой гемаглютинації
РНК – рибонуклеїнова кислота
СНІД – синдром набутого імунодефіциту
ЦМВ – цитомегаловірус
ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів

ВСТУП

ВІЛ-інфекція – це хвороба, що розвивається в результаті довготривалої персистенції вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) в лімфоцитах, макрофагах та клітинах нервової тканини і характеризується повільно прогресуючою дисфункцією імунної системи.

Обстеженню на ВІЛ-інфекцію підлягають особи, які мають симптоми або клінічні ознаки ВІЛ-інфекції. Патогномонічних симптомів ВІЛ-інфекції не має, але деякі ознаки можуть звернути увагу на можливість інфікування ВІЛ. До них відносяться: лихоманка, лімфаденопатія, висипка, міалгія, артралгія, виразки слизових та шкіри, діарея на протязі місяця, втрата ваги.

I. ЗАГАЛЬНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ

ВІЛ-1 належить до родини Retroviridae роду Lentivirus за рахунок наявності ферменту зворотної транскриптази вірус трансформує свій РНК-геном в ДНК, і в подальшому інтегрує в геном клітини-хазяїна. Вірусна частка в діаметрі 100-120 нм сферичної форми, зовнішня гліколіпідна оболонка двошарова має 72 виступи, які утворені глікопротеїнами gp120 та gp41. Під зовнішньою оболонкою вірусу розташований матриксний білок р17, який утворює матриксну оболонку. В центрі вірусної частинки знаходиться нуклеокапсид – ядро вірусної частинки (core), який утворюється протеїном р24. В нуклеокапсиді розташовані вірусний геном, представлений двома молекулами РНК, і ферменти – зворотна транскриптаза, рибонуклеаза Н, інтеграза та протеаза.

ВІЛ-1 інфікує клітини, на поверхні яких є рецептори, що мають назву CD4⁺. Рецептори знаходяться на поверхні Т-залежних лімфоцитів, макрофагів, клітин нервової системи та деяких інших. Ця особливість призводить до того, що в процесі патогенезу вірус уражає клітини імунної системи і поступово її виснажує. Довготривалий процес розвитку імунного дефіциту сприяє активації і розвитку чисельних опортуністичних інфекцій, саме які і призводять до загибелі інфікованого організму.

Для ВІЛ-інфекції характерний багаторічний перебіг хвороби, клінічно пов'язаний з прогресуючим зниженням імунітету, яке згодом призводить до розвитку тяжких форм опортуністичних захворювань.

Період ВІЛ-інфекції, коли клінічно проявляються опортуністичні інфекції, щільно пов'язаний з рівнем CD4⁺-лімфоцитів. При рівні CD4⁺-лімфоцитів < 500 кл/мл спостерігаються бактеріальні ураження, в тому числі пневмонії, оперізуючий лишай, кандидоз слизових оболонок рота, туберкульоз легень, криптоспоридіоз, волосиста лейкоплакія слизової рота, саркома Капоші, анемія, рак шийки матки, В-клітинна лімфома, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, лімфоїдний інтерстиціальний пневмоніт та інші, вказані в матеріалах ВООЗ.

Зниження рівня CD4⁺-клітин до 200-50 кл/мл сприяє розвитку пневмоцистної пневмонії, гострого та хронічного простого герпесу, токсоплазмозу, криптококозу, дисемінованого

гістоплазмозу, кокцидіомікозу, хронічного криптоспоридіозу, мікроспоридіозу, туберкульозу легень, позалегенового туберкульозу, кандидозного езофагіту.

Цитомегаловірусна інфекція та інфекції, викликані атипичними мікобактеріями (*M.avium*), розвиваються при зменшенні кількості CD4⁺-лімфоцитів до 50 кл/мл і нижче [2,8,6,7].

Опортуністичні захворювання – основна причина смерті хворих на СНІД. Від їх розвитку і перебігу залежать клінічна картина і тяжкість хвороби.

Опортуністичні інфекції викликають віруси, бактерії, гриби, найпростіші, гельмінти. Знання особливостей лабораторної діагностики збудників опортуністичних інфекцій може кардинально вплинути на їх лікування та профілактику (табл. 1,2).

Чільне місце серед вірусних опортуністичних інфекцій займає цитомегаловірусна, герпесвірусні інфекції.

Серед бактеріальних інфекцій велике значення має легеневий та позалегеновий туберкульоз, захворювання шкіри, легень, мозку, кишечника, статевих органів, які спричиняють сальмонели, стрептококи та стафілококи, синьогнійна паличка, гемофілюс інфлюенца, умовно-патогенні ентеробактерії.

Серед грибів – перше місце належить грибам із роду *Candida*, які у ВІЛ-інфікованих викликають різноманітні ураження. Досить часто ВІЛ-інфекція ускладнюється опортуністичними захворюваннями, збудниками яких є гриби: криптококи, актиноміцети, аспергіли. До ендемічних мікозів належать гістоплазмоз, кокцидіоїдоз.

У хворих на ВІЛ-інфекцію важливе значення мають представники найпростіших: токсоплазма, криптоспоридії, трипаносоми, циклоспори, ізоспори, лейшманії [7,8].

Серед найпростіших *Pneumocystis carinii* займає чільне місце, оскільки за своєю частотою і летальністю пневмоцистна пневмонія залишається найсерйознішою опортуністичною інфекцією.

За захворювання шкіри, легень, мозку, кишечника, статевих органів тощо спричиняють сальмонели, золотистий стафілокок, синьогнійна паличка, гемофілюс інфлюенца.

Опортуністичні інфекції часто поєднуються, що посилює тяжкість перебігу хвороби і значно ускладнює її діагностику.

Серед злоякісних пухлин у ВІЛ-інфікованих перше місце займають саркома Капоші та лімфома головного мозку.

Спираючись лише на клінічні симптоми хвороби, важко встановити діагноз. Визначити природу захворювань допомагають лабораторні дослідження при лабораторному нагляді (табл. 1).

2. ЛАБОРАТОРНИЙ МОНІТОРИНГ

Після встановлення діагнозу ВІЛ-інфекції, хворих ставлять на диспансерний облік в Центрі профілактики та боротьби зі СНІДом. Незалежно, якою лікувальною установою виявлено ВІЛ-інфікованого, нагляд здійснюють за місцем проживання інфікованого.

Диспансерний нагляд при ВІЛ-інфекції спрямований на активне виявлення ознак прогресування захворювання, контролю якості антиретровірусної терапії, діагностики, профілактики та лікування опортуністичних інфекцій.

Обсяг та періодичність лабораторних досліджень при диспансерному нагляді визначає Український центр профілактики та боротьби зі СНІДом і здійснюють Центр профілактики та боротьби зі СНІДом Автономної Республіки Крим, обласні, міські центри профілактики та боротьби зі СНІДом, кабінети інфекційних захворювань, ЛПУ за місцем проживання. При першому обстеженні необхідно встановити об'єктивний стан здоров'я пацієнта на час взяття його на диспансерний облік (табл. 3, 4).

ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРИ ДИСПАНСЕРНОМУ НАГЛЯДІ ЗА ВІЛ-ІНФІКОВАНИМИ

ОБОВ'ЯЗКОВІ ЛАБОРАТОРНІ ТЕСТИ ПРИ ПЕРВИННОМУ МЕДИЧНОМУ ОГЛЯДІ І ВЗЯТТІ НА ДИСПАНСЕРНИЙ ОБЛІК

ОБОВ'ЯЗКОВІ ЛАБОРАТОРНІ ТЕСТИ:

**ЗАГАЛЬНИЙ
АНАЛІЗ КРОВІ** гемоглобін, еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, лейкоцитарна формула, ШОЕ

ЗАГАЛЬНИЙ АНАЛІЗ СЕЧІ

БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ

білірубін та його фракції, аланінаміно-трансфераза (АЛТ), аспартатаміно-трансфераза (АСТ), глюкоза, сечовина, креатинін, лактатдегідрогеназа (ЛДГ), загальний білок, альбуміни, холестерин, α -амілаза крові, тригліцериди крові

ПАРАЗИТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

найпростіші, гельмінти – стронгілоїдоз, пнев-моцисти, гриби

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ

вірусні гепатити В і С, сифіліс

ТЕСТИ

тест на вагітність у жінок;
шкірна проба на туберкульоз

У подальшому перелік тестів та періодичність обстежень визначає лікар відповідно до результатів первинного обстеження.

ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ НАЯВНОСТІ ОЗНАК ОПОРТУНІСТИЧНИХ ІНФЕКЦІЙ

БІОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ

холестерин, ліпіди, тригліцериди

БАКТЕРІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

кандиди, криптококи, атипіві мікози, туберкульоз, патогенні та умовно-патогенні ен-теробактерії (сальмонели, шигелли та ін.), стрептококи, нейсерії, стафілококи, гемофіли, аспергіли, актиноміцети

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ НА ВИЯВЛЕННЯ

- антитіл маркерів вірусу гепатиту В – HbsAg; HbcorAg – IgM, IgG, анти HbsAg;
- антитіл до вірусу гепатиту Д - IgM, IgG;
- антитіл до вірусу гепатиту С - IgM;
- антитіл до вірусу гепатиту А - IgM, IgG;
- антитіл до вірусу простого герпесу - IgM, IgG;
- антитіл до токсоплазмозу - IgM, IgG, IgA;
- антитіл до цитомегаловірусу - IgM, IgG

ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

визначення кількості CD4⁺ та CD8⁺ лімфоцитів

ВИБІРКОВІ ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

| | |
|---|--|
| СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ КРОВІ | антитіла до герпесу зостер; антитіла до вірусу Епштейна-Барр |
| ПАРАЗИТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ | криптоспоридіоз, ізоспоров, лейшманіоз, амебіаз, коросту |
| БАКТЕРІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НА | гістоплазмоз, бластомікоз, анаероби (клостридії дефіциле), бактероїди |
| МОРФОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ | біоптатів лімфовузлів та тканин мозку, легень, слизових кишечнику на цитомегаловірус, токсоплазми, туберкульоз, пневмоцисти, патогенні гриби, вірусні гепатити |
| МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ | визначення рівня РНК ВІЛ в плазмі крові (вірусне навантаження); визначення наявності генетичного матеріалу збудників опортуністичних інфекцій за методом ПЛР (вірусів, бактерій, грибів, найпростіших) |

Різноманітність нозологічних форм опортуністичних інфекцій потребує знання спеціальних методів діагностики, коректне їх використання, своєчасний збір біологічного матеріалу, доставка його в лабораторію, оцінка одержаних результатів залежно від стадії хвороби.

Обов'язкові лабораторні тести включають визначення рівня ферментів АЛТ, АСТ в сироватці крові з метою оцінки можливості розвитку гепатитів та оцінки гепатотоксичності лікувальних препаратів. Дослідження сечі і креатиніну призначають з метою оцінки функції нирок, рівня глюкози – функції підшлункової залози.

Визначення загальної кількості лейкоцитів, лімфоцитів, тромбоцитів в динаміці дозволить стежити за побічною дією препаратів антиретровірусної терапії та станом імуносупресії у хворих.

Лабораторні тести при наявності ознак симптомів опортуністичних інфекцій – включають великий набір показників, які дозволяють вчасно визначити збудника опор-

туністичних інфекцій, призначити лікування, вжити профілактичних заходів з метою попередження розповсюдження інфекції.

Якщо дозволяють ресурси, тестування на вірусне навантаження та дослідження резистентності вірусів доцільно здійснювати в лабораторіях, за якими закріплені відповідні функції.

МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОПОРТУНІСТИЧНИХ ТА ІНШИХ ІНФЕКЦІЙ У ВІЛ-ІНФІКОВАНИХ

2.1. ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

2.1.1. ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ В

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, плазма.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: в діагностиці вірусного гепатиту В головне значення належить визначенню комплексу маркерів гепатиту методом ІФА згідно з інструкцією до діагностичних наборів.

Поверхневий антиген гепатиту В (HbsAg): поверхневий антиген гепатиту В у сироватці крові в нормі відсутній.

Виявлення поверхневого антигену гепатиту В в сироватці крові підтверджує гостре або хронічне інфікування вірусом гепатиту В. При гострому захворюванні HbsAg виявляється в останні 1–2 тижні інкубаційного періоду і в перші 2–3 тижні перебігу хвороби. Частота виявлення HbsAg залежить від чутливості методу дослідження. Метод ІФА дозволяє виявити HbsAg у 90 % хворих. В гострому періоді виявляється зворотний зв'язок між концентрацією HbsAg в сироватці і тяжкістю хвороби. При злоякісних (фульмінантних) формах гепатиту В концентрація HbsAg низька або зовсім не виявляється. Рівень HbsAg поступово знижується до повного зникнення за час від 3 до 6 місяців реконвалесценції.

Якщо HbsAg виявляється у практично здорових людей, то необхідно зазначити інші маркери вірусного гепатиту В. Пацієнтів, у яких протягом 3 місяців і довше виявляється HbsAg, відносять до хронічних носіїв поверхневого антигену гепатиту В.

Антитіла до HBsAg гепатиту В у сироватці крові:

Антитіла до HBsAg у сироватці в нормі відсутні. Антитіла до HBsAg виявляються в кінці гострого періоду вірусного гепатиту В або через 3 місяці від початку захворювання і зберігаються протягом 5 років. Виявляються антитіла до HBsAg методом ІФА і відносяться до імуноглобулінів. Наявність антитіл до HBsAg в сироватці крові характеризує імунну відповідь конкретного хворого. Служить критерієм ретроспективної діагностики вірусного гепатиту В.

ЗАГАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО ЯДЕРНОГО АНТИГЕНУ ГЕПАТИТУ В

(анти – HBcAg) у сироватці

Антитіла до ядерного антигену гепатиту В у сироватці крові в нормі відсутні. Ядерний антиген гепатиту В виявляється тільки у гепатоцитах.

У крові у вільному вигляді HBcAg не виявляється. Антитіла до ядерного гепатиту В з'являються першими серед інших антитіл, пов'язаних з гепатитом В. Загальні антитіла до ядерного антигену гепатиту В складаються з імуноглобулінів класу М та G. Визначення загальних антитіл до ядерного антигену гепатиту В використовується лише для ретроспективної діагностики гепатиту В, якщо HBsAg не виявляється.

Для того щоб встановити, в якій стадії розвитку знаходиться гепатит В, необхідно додатково виявити антитіла IgM та IgG. Антитіла класу IgM – маркер активної реплікації вірусу, тобто гострої інфекції, а антитіла IgG – перенесеної інфекції. Виявлення анти–HBcAg IgM – переконливий доказ діагностики вірусного гепатиту В, особливо якщо не визначається HBsAg, вони циркулюють в крові протягом 2–5 місяців до періоду реконвалесценції, а потім зникають, що розцінюється як ознака повного очищення організму від вірусу гепатиту В.

АНТИТІЛА IgG ДО ЯДЕРНОГО АНТИГЕНУ ГЕПАТИТУ В

(анти–HBcAg IgG) у сироватці.

Антитіла HBcAg IgG в сироватці крові в нормі відсутні. Анти–HBcAg IgG з'являються в гострий період гепатиту В і зберігаються протягом усього життя. Анти–HBcAg IgG – провідний маркер перенесеного гепатиту.

HBcAg АНТИГЕН ГЕПАТИТУ В У СИРОВАТЦІ

HBcAg – антиген в сироватці в нормі відсутній. HBcAg визначається в крові хворих в гострому періоді, зникає раніше HBsAg. Якщо HBcAg має високий рівень або визначається на протязі більше 8 тижнів, то це дає підставу запідозрити хронічну інфекцію. Наявність HBcAg в крові свідчить про присутність в організмі хворого інфекції гепатиту В і визначається у випадку наявності в крові HBsAg антигену. Наявність HBcAg антигену свідчить про продовження реплікації вірусу і інфекційності хворого. HBcAg – маркер гострої фази та реплікації вірусу гепатиту В.

АНТИТІЛА ДО HBeAg ГЕПАТИТУ В (анти–HBeAg) У СИРОВАТЦІ

Антитіла до HBeAg гепатиту В у сироватці в нормі відсутні. Виявлення антитіл свідчить про інтенсивне звільнення організму від вірусу гепатиту В, вони знаходяться в організмі до 5 років після перенесеної інфекції. При хронічному гепатиті анти–HBeAg виявляються в крові разом з HBsAg. Антитіла до HBeAg визначаються методом ІФА, дослідження крові проводять в динаміці.

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ:

виявлення генетичного матеріалу вірусу гепатиту В методом полімеразної ланцюгової реакції. Методики ПЛР виконуються згідно з інструкцією до набору.

2.1.2. ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

Інфекція розповсюджується парентерально при спільному користуванні голками та шприцями в середовищі наркоманів, при переливанні крові, гемодіалізі, травмах або уколах, будь-яких ушкодженнях шкіри або слизових і передачі вірусу від хворої людини.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, плазма.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: методом ІФА визначають антитіла до вірусу гепатиту С. На ранній стадії захворювання або у разі загострення хронічної інфекції виявляються імуноглобуліни М; імуноглобуліни G виявляються в період реконвалесценції і свідчать про перенесену інфекцію (ретро-

спективна діагностика гепатиту С). Дослідження проводять з парними сироватками.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГІЧНІ

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ: генетичний матеріал гепатиту С визначають методом ПЛР. Методики ПЛР виконують згідно з інструкцією до набору.

2.1.3. ГЕПАТИТ D

(дельта-вірусна інфекція): в нормі в крові антитіл та антигенів гепатиту немає. Виявляється тільки у пацієнтів з гепатитом В. На гепатит D хворіють в основному наркомани, які вводять наркотики у вену, їх статеві партнери, жінки із сфери сексуальних послуг. Вірус гепатиту D виявляється у випадках тяжкого гострого гепатиту В або коли у хворого на хронічний вірусний гепатит В прогресує ураження печінки.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, плазма.

МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: методом ІФА визначають антитіла та антиген Дельта в сироватці крові.

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ: генетичний матеріал гепатиту D визначають методом ПЛР. Методики ПЛР виконуються згідно з інструкцією до набору.

2.1.4. ГЕРПЕТИЧНА ІНФЕКЦІЯ

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, плазма.

СЕРОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ: при серологічній діагностиці герпетичної інфекції виявляють антитіла до простого герпесу 1,2 (HSV-1; HSV-2).

Антитіла до вірусу простого герпесу в сироватці крові виявляють у 80–90% дорослого населення. Одноразове виявлення антитіл не дає чіткого уявлення про стадію захворювання. Потрібне дослідження крові на наявність IgM та IgG. При гострому захворюванні рівень IgM зростає, пік рівня антитіл досягає на 4–6 тижні хвороби. При реінфекції рівень антитіл майже не змінюється, навіть при вираженому клінічному перебігу хвороби. Антитіла до герпетичної інфекції досліджують методом ІФА в динаміці.

Для виявлення ДНК герпес-вірусів найбільша чутливість характерна для ПЛР. Такі методи, як цитологічні, електронна мікроскопія, малоінформативні, неспецифічні.

2.1.5. ІНФЕКЦІЙНИЙ МОНОНУКЛЕОЗ – збудник вірус Епштейн-Бар-ру – вірус герпесу людини 4 типу.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, плазма, слина.

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ: при інфекційному мононуклеозі серологічні дослідження визначають антитіла до вірусу Епштейн-Барр у сироватці крові. З цією метою використовують реакцію Пауля-Буннеля, яка визначає гетерофільні антитіла до еритроцитів барана. Методом ІФА визначаються маркери EBV з кількісним визначенням IgM і IgG. Інтерпретація результатів здійснюється відповідно до інструкції для тест-системи.

ГЕМАТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ: загальний аналіз крові, в якому виявляють лейкоцитоз, лімфоцитоз, моноцитоз, атипові мононуклеари.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: генетичний матеріал ВЕБ визначають методом ПЛР. Методика виконується згідно з інструкцією до діагностичного набору.

2.1.6. ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: сеча, слина, промивні води шлунка, мокротиння, промивні води бронхів, вагінальний та цервікальний секрет, кров, грудне молоко.

СВІТЛОВА МІКРОСКОПІЯ: з патогенного матеріалу готують нативні мазки, висушують на повітрі, фіксують метиловим спиртом, фарбують азур-еозином. Матеріал від хворих збирають у центрифужну пробірку, центрифугують при швидкості 3000 об./хв. 20 хв. Видаляють надосадкову рідину і з осадку роблять мазки. Мазки висушують на повітрі, фіксують метиловим спиртом і фарбують азур-еозином за загально-прийнятою методикою.

РЕЗУЛЬТАТ: при мікроскопії виявляються великі клітини з гіперхромним ядром. В ядрі знаходяться вclusions, ядро оточене світлою зоною. В цитоплазмі виявляються вclusions, які надають клітині вигляд «пташиного» або «совиного ока».

Мікроскопічна експрес-діагностика

(світловий мікроскоп): З метою експрес-діагностики ЦМВУ у вагітних досліджують вагінальний або цервікальний секрет. Матеріал для дослідження збирають ватним тампоном; вагінальний секрет із задньої стінки піхви, а цервікальний секрет з каналу шийки матки. Матеріал, який досліджують, розміщують на 3 предметних скельцях, розподілених на дві половини. На одній половині мазок із вагінального секрету, на другій – із цервікального. Мазки висушують на повітрі, фіксують в суміші Нікіфорова, фарбують азур-созином.

РЕЗУЛЬТАТ: в цитоплазмі клітин виявляють вклучення, які надають їм вигляд, який образно називають «свинине око».

СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД: антитіла до цитомегаловірусу у сироватці крові в нормі відсутні. В серологічній діагностиці ЦМВ застосовують переважно інформативні методи, які виявляють антитіла, що належать до класу імуноглобулінів – IgM та IgG. Виявлення IgM свідчить про гостре захворювання або про загострення хронічного.

РЕЗУЛЬТАТ: Антитіла IgG з'являються в період реконвалесценції і зберігаються у тих, хто перехворів у віці до 10 років.

Дослідження рівнів IgM та IgG слід проводити в динаміці (наростання, зниження, стабільність).

Антитіла до ЦМВ досліджують методом імуноферментного аналізу, згідно з інструкцією до набору. Методом ПЛР виявляють генетичний матеріал цитомегаловірусу у клінічних зразках згідно з інструкцією до діагностичного набору. Перевагу слід надавати кількісним тест-системам для ІФА.

2.2. ДІАГНОСТИКА ІНФЕКЦІЙ,

ВИКЛИКАНИХ БАКТЕРІЯМИ

2.2.1. САЛЬМОНЕЛЬОЗ, ШИГЕЛЬОЗ, УМОВНО-ПАТОГЕННІ ЕНТЕРОБАКТЕРІЇ

На ранніх стадіях СНІДу проходять як локалізовані інфекції, в пізні – носять септичний характер.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, сеча, фекалії, жовч, промивні води шлунка, блювоти, ліквор.

БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: а) посів патогенного матеріалу на тверді поживні середовища. Плоскірева, вісмут-сульфітний агар, ендо, Левіна, селективні середовища (магнієва або селетінова). б) підозрілі колонії одсівають на комбіновані середовища (Олькеницького, Кліглера, Ресселя) в) культуру вивчають за морфологічними, тинкторіальними, ферментативними властивостями. Вивчають антигенну структуру в реакції аглютинації на склі з О - і Н аглютинуючими діагностичними антисиворотками.

За результатами культуральних, морфологічних, тинкторіальних, біохімічних та серологічних властивостей вивчають вид культури.

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ:

- Антитіла до сальмонел, шигел виявляють в РНГА та ІФА.
- Генетичний матеріал виявляють методом ПЛР.
- Для експрес-діагностики використовують методи МФА, РНГА з імуноглобуліновим діагностикомом.
- Методики ІФА, РНГА, МФА, ПЛР виконують згідно з інструкцією до набору.

2.2.2. ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНІ УМОВНО-ПАТОГЕННИМИ БАКТЕРІЯМИ

Збудники Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella, Bacteroides, Pseudomonas aeruginosa, S. aureus, Sh, foecocis, Klostridia deficile,

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, сеча, фекалії, жовч, промивні води шлунка, блювоти, ліквор, змиви з слизових та шкіри, виділення зі статевих органів, гній, біоптати лімфовузлів та тканин.

Бактеріологічний матеріал: висів патологічного матеріалу на диференціально-діагностичні поживні середовища з метою одержання чистих культур, з подальшим вивченням морфологічних, тинкторіальних, біохімічних, серологічних властивостей з метою ідентифікації до виду.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ:

- Антитіла до збудників інфекцій визначають ме-

тодами МФА, ІФА, РНГА, ЛА (латекс-аглотинації).

- Антигени визначають методом РНГА з імуноглобуліновим діагностикомом.
- Наявність генетичного матеріалу визначають за методом ПЛР.
- Методики виконуються згідно з інструкцією до діагностичного набору.

Бактеріологічні, гематологічні, загальноклінічні, біохімічні методи дослідження виконують згідно з методиками, затвердженими наказами МОЗ України, уніфікованими методиками та методиками, викладеними в спеціальній літературі.

Схеми лабораторної діагностики, перелік та періодичність дослідження лабораторних тестів залежно від етіології опортуністичних інфекцій та стадії СНІДу представлені в таблицях 1,2,3,4.

2.2.3. ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ ТА ПОЗАЛЕГЕНЕВИХ ФОРМ

– збудник *Mycobacterium tuberculosis*

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: харкотиння, промивні води бронхів, секвестри тканин, сеча, фекалії, кров, шкіра, слизові оболонки, мозок, печінка, нирки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: мікроскопічне дослідження фарбованих мазків (світловий мікроскоп): мазок фіксують над полум'ям пальника: через фільтрувальний папір на мазок наливають карболовий фуксин Циля і скло обережно підігрівають над полум'ям до появи пари (3 рази), папір знімають, препарат промивають дистильованою водою; для знебарвлення фарбованого препарату опускають скло з мазком в склянку з 10 % сірчаною або 20 % азотною кислотою на декілька секунд; промивають водою і дофарбовують водним розчином метиленового синього або синім розчином Лефлера 5 хв., змивають водою, висушують.

1.Метод флотоції:

у матеріал вносять розчин NaOH, дистильовану воду і бензол або ксилол в пропорції 1:1:1. Енергійно струшують 5–10 хв., піна, яка утворилась, спливає і несе з собою мікобактерії, з неї роблять мазки і фарбують за методом Циля-Нільсена.

2.Люмінесцентна мікроскопія (люмінесцентний мікроскоп):

мазки патологічного матеріалу фарбують флюорохромом (аурамінодоміном). Метод чутливий і дозволяє виявити навіть незначну кількість мікобактерій, а також форми із зміненими культуральними і тинкотиральними властивостями.

РЕЗУЛЬТАТ: в мазках, пофарбованих за Цилем–Нільсеном кислотостійкі мікобактерії червоного кольору. При люмінесцентній мікроскопії мікобактерії біло-жовтого кольору.

БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: патологічний матеріал відмивають фізіологічним розчином і засівають на тверде середовище Левенштайн–Йенсена. Ріст культури триває 2–12 тижнів, що є значним недоліком методу, але метод дає можливість ідентифікувати *Mycobacterium tuberculosis* від атипових мікобактерій, оцінити вірулентність чистої культури, визначити чутливість до лікувальних препаратів.

СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: використання серологічних методів дозволяє скоротити час лабораторного підтвердження клінічного діагнозу. З цією метою використовують метод ІФА для виявлення в сироватці крові антигенів мікобактерій і антитіл до них.

Метод ІФА активно використовується при діагностиці позалегенових форм туберкульозу. Аналізуючи результати дослідження антитіл, необхідно слідкувати за динамікою рівня антитіл. Виявлення антитіл не можна використовувати як єдиний доказ діагнозу.

2.2.4. АТИПОВІ МІКРОБАКТЕРІОЗИ:

збудники *M. avium* та *M. Kansasii* викликають лімфаденіти шкіри, легень, кишечника.

МІКРОСКОПІЧНИЙ МЕТОД: при мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Циля – Нільсона, мікобактерії забарвлюються в червоний колір.

Бактеріологічний метод: патологічний матеріал засівають на середовища Леванштейна-Йенсена. Культуру одержують за 12–15 днів, ідентифікують протягом

15–40 днів. На середовищі Леванштейна-Йенсена колонії червоно-жовтого кольору.

МЕТОД ПЛР: дозволяє виявити атипіві мікобактерії за 2–3 години. Методика виконується згідно з інструкцією до діагностичного набору

2.3. ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНІ НАЙПРОСТІШИМИ

2.3.1. ПНЕВМОЦИСТОЗ – збудник *Pneumocystis carinii*.

Матеріал для дослідження: слиз із горла та трахеї, аспірат з бронхів, біоптат легеневої тканини, харкотиння.

Методи дослідження: дослідження пофарбованих препаратів слизу з гортані, горла, аспірату бронхів, промивних вод бронхів, біоптатів легень, харкотиння.

Приготування мазка харкотиння: зразок харкотиння змішують з однаковим об'ємом муколітику 1% р-ну NaOH (гідроокису натрію) або 2% р-ну димексиду в центрифужній пробірці, суміш перемішують і інкубують 5-15 хв. при 370С, після чого розводять тотожною кількістю формалін-спирту (10% формалін, 96% спирт 1:1), центрифугують протягом 10 хв. при швидкості 1500 об/хв. З центрифугату готують 4-8 мазків на предметних скельцях, висушують та фарбують.

Приготування мазка промивних вод бронхів: промивні води змішують з рівним об'ємом 50% етилового спирту, центрифугують 15 хв. при швидкості 1500 об/хв., осад розподіляють на 4-8 предметних скельцях, висушують та фарбують. Матеріал досліджується негайно.

Методи фарбування:

1. Скринінгові методи фарбування. Фарбування за методами: Романовського-Гімза; за Гремом; за Райтом - дають уявлення про морфологію збудника.

2. Спеціальні методи фарбування дають змогу чітко диференціювати стінки цист без чіткої уяви про клітинний вміст.

3. В 1989 р. Walker запропонував модифікований метод фарбування Романовського-Гімза. Готовий мазок фіксуємо 10–15 хв. в суміші оцтового реагенту (45 мл льодової оцтової кислоти, 15 мл концентрованої сірчаної кислоти), повільно перемішують скляною паличкою (контейнер з кислотами тримають у про-

холодній воді). Мазок промивають 5 хв. проточною водою і фарбують 10 % фарбою Романовського-Гімза у фосфатному буфері, рН – 7,2, 30 хв. Мазки висушують і досліджують в світловому мікроскопі.

Фарбування розчином кристалічного фіолетового за М.В.Лавдовською

1. Мазок, зафіксований в суміші Нікіфорова, занурюють в розчин концентрованої сірчаної кислоти (93,6 – 95,5 %) на 10 хв.

2. Промивають проточною водою 10 хв., висушують на повітрі.

3. Скельця переносять в 1 % водний розчин кристалічного фіолетового на 1 хв.

4. Надмір фарби вилучають, мазки прополіскують 20 % водним розчином сульфату міді 10–20 сек.

5. Промивають мазки проточною водою 1 хв.

6. Пофарбовані мазки висушують на повітрі.

Фарбування розчином толуїдинового синього.

1. Препарат фіксують 10–15 хв. в 10 % формаліні, змивають дистильованою водою.

2. Мазки занурюють в сульфатно-оцтовий реагент на 5 хв., потім реагент перемішують скляною паличкою і залишають в ньому ще на 10 хв.

3. Підготовлені мазки фарбують 3 хв. 0,15 % толуїдином синім (75 мг толуїдинового синього + 15 мл дистильованої води + 0,5 мл концентрованої соляної кислоти + 35 мл абсолютного етилового спирту).

4. Змивають проточною водою.

5. Дофарбовують 0,25 % водним метаніловим жовтим –2 хв., змивають водою, висушують на повітрі.

Фарба придатна протягом одного року; сульфатно-оцтовий реагент – один тиждень.

РЕЗУЛЬТАТ: при мікроскопічному дослідженні пофарбованих мазків – оболонка цист інтенсивно фарбується в синьо-фіолетовий колір.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: антигени *Pneumocystis carinii* в харкотинні в нормі не виявляються. Пневмоцисти – факультативні патогени, які знаходяться в альвеолах легень тварин та хворої людини. Найбільша кількість їх – у промивних водах бронхів (лаваж) та в

біоптатах, одержаних при трансбронхіальній біопсії. З метою діагностики антигенів пневмоцисти використовують метод прямої флюоресценції. Дослідження промивних вод та біоптатів при прямій флюоресценції дає позитивний результат у 90 % пацієнтів, хворих на СНІД.

РЕЗУЛЬТАТ: при мікроскопічному дослідженні цисти синьо-фіолетового кольору, тканинні елементи і фон – синьо-зелені.

2.3.2. ТОКСОПЛАЗМОЗ – збудник *Toxoplasma gondii*

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, послід породілі, біоптати лімфатичних вузлів, інших органів, у тому числі мозку, або осад люмбального ліквору.

МЕТОД МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ: мікроскопія фарбованих мазків в світловому мікроскопі. Знахідки паразитів в крові безперспективні, в біоптатах лімфовузлів ідентифікація *T. Gondii* складна в зв'язку з малою кількістю токсоплазм. Відносно легко ідентифікуються ооцисти і трофозоїти *T. Gondii* в біоптатах мозку та люмбальному лікворі. Фарбування за Романовським – Гімза, Райтом. Мікроскопія при збільшенні об.90 ок. 7.

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ: використовують методи діагностики токсоплазмозу, які вказують на наявність токсоплазмозних антитіл (РЗК, РНГА, ІФА тощо). На жаль, серологічні методи малоінформативні при діагностиці токсоплазмозу ЦНС – патології, яку викликає *T. Gondii* у хворих на СНІД. Якщо в сироватці крові виявлено в низьких або середніх титрах ІgG до токсоплазм, це свідчить про стан інфікованості хворого.

З діагностичної точки зору, важливо виявити антитіла до токсоплазм у хворих на СНІД в люмбальному лікворі. Виявлення ІgG в крові і лікворі свідчить про свіжу токсоплазмозну інфекцію. Виявлення ІgG в крові і лікворі у високих титрах може свідчити про токсоплазмоз. Серологічні дослідження необхідно проводити в динаміці.

T. Gondii в біологічних рідинах визначають методом ПЛР. Токсоплазмозні імуноглобуліни М і G визначають методом ІФА. Методики виконують згідно з інструкцією до діагностичних наборів.

При токсоплазмозі необхідно виділяти токсоплазмозну інфекцію (носіїство) та токсоплазмоз (захворювання). Головним в лабораторній діагностиці є не сам факт виявлення антитіл, а уточнення стадії процесу – встановлення носійства чи хвороби. Визначення антитіл імуноглобулінів класу ІgM та ІgG дозволяє підтвердити або спростувати діагноз токсоплазмозу.

Антитіла ІgM до токсоплазм в сироватці крові в нормі відсутні.

Антитіла ІgM до токсоплазм з'являються в гострому періоді хвороби і можуть зберігатися до 2 років. Визначення ІgM необхідно для діагностики гострого періоду токсоплазмозної інфекції. Антитіла ІgG з'являються в період реконвалесценції, у перехворілих ІgG зберігаються до 10 років. Виявлення ІgG необхідне для встановлення періоду реконвалесценції токсоплазмозу та оцінки рівня імунітету. Рівень антитіл ІgM та ІgG необхідно визначити в динаміці з інтервалом 14–20 днів методом ІФА. Перевагу при тестуванні методом ІФА для визначення імуноглобулінів класу G слід віддавати тест-системам, що дозволяють визначити кількість антитіл в міжнародних одиницях.

2.3.3. КРИТОСПОРИДИОЗ – збудник кокцидії роду *Cryptosporidium*

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: фекалії, блювоти, харкотиння, промивні води бронхів, біоптати слизової оболонки кишечника, жовч.

МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: світлова мікроскопія.

Консерванти для тривалого зберігання матеріалу:

10 % розчин формаліну; 2,5 % розчин біхромату калію; консервант Турдієва; (80 мл дистильованої води, 0,16 г азотнокислого натрію, 10 мл концентрованого формаліну, 2 мл гліцерину, 8 мл розчину Люголя). Наявність формаліну у складі консерванту Турдієва забезпечує безпеку роботи медпрацівників з патогенним матеріалом.

Приготування мазка:

На предметне скло наносять невелику кількість матеріалу і роблять тонкий мазок, висушують на повітрі, фіксують в суміші Нікіфорова протягом 10–15 хв., тримають над полум'ям спиртівки або в метанолі 2–3 хв., фарбують карболфуксином за Циль-Нільсеном в модифікації:

- 1) Приготування робочого розчину карбол фуксину:
 - а) 10 г основного фуксину розчиняють в 100 мл абсолютного спирту.
 - б) 50 г фенолу нагрівають і розчиняють в невеликій кількості дистильованої води. Після чого спиртовий розчин фуксину змішують з розчином фенолу і доводять до 1 л дистильованої води.
- 2) Мазки фекалій фарбують 5–10 хв.
- 3) Промивають мазки водопровідною водою, а потім знебарвлюють розчином (100,0 мл 95 % етилового спирту, 1 мл концентрованої соляної кислоти) 20–30 сек.
- 4) Промивають проточною водою.
- 5) Дофарбовують мазки в 0,25 % розчині малахітового зеленого 30 сек (3 г сухої фарби малахітового зеленого додають до 100,0 мл дистильованої води). Зберігають довго в посуді з темного скла. Для фарбування берем: 1 мл 3 % малахітового зеленого, 100,0 мл гліцерину, 100,0 мл дистильованої води.
- 6) Мазки промивають проточною водою, висушують на повітрі.
- 7) Мікроскопія в світловому мікроскопі при збільшенні 100 x 10.

РЕЗУЛЬТАТ: Ооцисти криптоспоридія фарбуються в різні відтінки червоного кольору, мають вигляд округлих утворень, діаметром біля 5 мк. Супутня мікрофлора фарбується в зелений колір.

ІМУНОЛЮМІНЕСЦЕНТНА МІКРОСКОПІЯ: діагностика захворювань заснована на виявленні антигенів криптоспоридій у фекаліях. Антигени криптоспоридій, в матеріалі який досліджується в нормі, відсутні. Фекалії хворих досліджують методом імунофлюоресценції з метою виявлення ооцист мікроспоридій. Метод чутливий та специфічний. При виявленні навіть однієї флюоресцентної плями дослідження позитивне.

2.3.4. ІЗОСПОРИОЗ – збудник кокцидії роду *Isospora*.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: фекалії, жовч, біоптати слизової оболонки кишечника.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: мікроскопічне дослідження.

Мікроскопічне дослідження нативного мазка:

1. Метод збагачення за Фюлеборном. Приготування флотаційного розчину, 400, 0 г хлориду натрію розчиняють в 1,0 л води, питома вага 1,2. Співвідношення фекалій і флотаційного розчину 1:20. Поверхнева плівка знімається через 40–50 хв. і мікроскопію здійснюють в світловому мікроскопі (7X20).

2. Невеликий шматочок фекалій розміщують на предметному склі в краплі дистильованої води або в розчині Люголя, покривають покривним склом. Препарат повинен бути тонким, чим тонший препарат, тим легше знайти в ньому ооцисти. Ооцисти дуже легкі, внаслідок чого вони знаходяться біля краю покривного скла. Для позитивного дослідження необхідно продивитись приблизно 10 препаратів.

Мікроскопія Об'єктив 40, окуляр x 10 або x 7, конденсор опущений, діафрагма напівзакрита (7,12)

2.4. ДІАГНОСТИКА ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЙ

2.4.1. КАНДИДОЗ – збудник *Candida albicans*.

Діагностика поверхневого кандидозу побудована на виявленні елементів грибів при мікроскопії пофарбованих препаратів або виділення чистої культури грибів бактеріологічним методом дослідження.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: кров, харкотиння, слиз з рота, носа, гній, фекалії, промивні води бронхів, шлунка, жовч, сеча, зскрібок зі шкіри, нігтів, виділення з очей, вух, статевих органів, біоптати органів.

МІКРОСКОПІЧНИЙ МЕТОД ДОСЛІДЖЕННЯ: Патологічний матеріал можна вивчати в нефарбованих або фарбованих препаратах. Для приготування нативних препаратів рідкий матеріал поміщають в суміш спирту з гліцерином 1:1, додають 2 частини води. Шкірні часточки, зскрібки з нігтів попередньо обробляють 10 % лугом. При мікроскопії звертають увагу на наявність справжнього міцелію (наявність перегородок) та псевдоміцелію, морфологію спор.

Фарбування матеріалу

При фарбуванні мазків за Грамом, дріжджові клітини фарбуються в темно-фіолетовий колір; фарбовані за Цилем-Нільсеном – дріжджові клітини сині; за Романовським-Гімзом – рожево-фіолетові. Для диференціювання дріжджоподібних клітин від справжніх дріжджів використовують модифіковане фарбування за Цилем-Нільсеном:

1. Водний фуксин Пфейфера наливають на шматочок фільтрувального паперу, яким покривають мазок, підігривають до появи пари.
2. Знімають фільтрувальний папір, надмір фарби (знімають) змивають водою.
3. Капають на мазок 5 % сірчану кислоту на 1–2 секунди.
4. Змивають кислоту водою.
5. Дофарбовують 1% малахітовим зеленим, або 1% метиленовим синім водними розчинами 10–20 хв.

РЕЗУЛЬТАТ: світлова мікроскопія: справжні дріжджі забарвлюються в рожевий колір.

БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД: найбільш достовірним методом діагностики кандидозу є виділення культури *Candida albicans*.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: мазок з слизової зівя, носа, статевих органів, очей, шкіри, вух – забирають стерильним тампоном. Тампони вміщують в 10,0 мл рідкого середовища Сабуро, струшують зі скляними кульками 5 хв. Одержаний змив (0,1 – 0,2 мл) засівають на тверде поживне середовище – Сабуро, або сусло-агар.

Харкотиння гомогенізують стерильним фізіологічним розчином 10^6 і засівають по 0,2 мл на тверде поживне середовище – Сабуро, сусло-агар, поживний агар.

Фекалії розводять стерильним фізіологічним розчином 10^3 і засівають по 0,1 мл на тверде поживне середовище, оброблене розчином антибіотика.

Сечу центрифугують і засівають 0,1 мл осаду на тверде поживне середовище – Сабуро, сусло-агар.

Кров засівають на рідке середовище Сабуро у співвідношенні 1:10.

Жовч засівають після центрифугування 0,1 осаду на тверде поживне середовище.

Поживні середовища: Сабуро, сусло-агар, поживний агар.

ДОСЛІДЖЕННЯ: після інкубації посівів патологічного матеріалу на середовище Сабуро або сусло-агару при 37 °С на протязі 48 год. вивчають ріст колоній, їх кількість, підозрілі колонії досліджують.

Основні відмінності сахароміцетів від дріжджоподібних грибів:

1. Справжні дріжджі утворюють аскоспори.
2. Сахароміцети не мають псевдоміцелію.
3. Сахароміцети не утворюють хламідоспор.

Видову ідентифікацію дріжджоподібних грибів здійснюють шляхом вивчення ферментативної активності. Тип філаментатії вивчають на картопляній воді або крохмалерисовому відварі. Видову диференційну діагностику грибів типу кандиди проводять за здатністю розщеплювати вуглеводи (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза).

СЕРОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ: антитіла до грибів роду *Candida* (*Candida albicans*) в сироватці в нормі не виявляються. Діагностичний титр 1:80. При вісцеральних формах кандидоза велике значення мають серологічні дослідження. Методом ІФА антитіла до *Candida albicans* визначаються у 90 % хворих у перші 2 тижні захворювання і зберігаються до 5 років. Для підтвердження діагнозу сироватки досліджують у динаміці, збільшення рівня антитіл в 4 рази – свідчить про гостру стадію захворювання. Зниження рівня антитіл в 4 рази свідчить про стадію реконвалесценції та успішну терапію захворювання. Серологічна діагностика при поверхневому кандидозі малоефективна і лише в тяжких випадках супроводжується підвищенням рівня антитіл, доцільно використовувати її при діагностиці вісцеральних форм кандидозу. Виявлення кандидозного антигену доцільно проводити у хворих з інвазійним кандидозом.

2.4.2. КРИПТОКОКОЗ – збудник *Cryptococcus neoformans*.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: харкотиння, ліквор, гній, сеча, біоптати уражених органів, секційний матеріал.

Мікроскопічне дослідження: кров і ліквор досліджують в нефарбованих препаратах, виявляючи круглі або овальні клітини від 2 до 20 мкм. Для більш чіткого виявлення капсули гриба краще готувати тушеві препарати з осаду люмбального ліквору. Для цього туш розводять дистильованою водою 1:4, центрифугують 10 – 15 хв. при 3000 об./хв. Надосадову рідину збирають в окрему ємкість і стерилізують при 110 °С протягом 30 хв. Краплю ліквору змішують з краплею розведеної туші на предметному склі, покривають покривним скельцем і мікроскопують за допомогою імерсійного об'єктива при зменшеному освітленні. Якщо грибів мало, то ліквор рекомендують центрифугувати і тушевий препарат готують із осаду ліквору. Виявлені на темному фоні дріжджоподібні клітини оточені світлим обручем (капсула) є доказом етіологічного обґрунтування криптококозу. Товсту краплю крові фарбують будь-яким барвником і шукають в препараті дріжджоподібні клітини, оточені капсулою.

БАКТЕРІОЛОГІЧНИЙ МЕТОД: найбільш доказовий метод – метод бактеріологічного дослідження матеріалу. З метою одержання чистих культур, патогенний матеріал засівають на тверді поживні середовища. Використовують середовище Сабуро та сусло-агар. Інкубація 37° С. Колонії виростають на 2–3 день при t – 37° С, частину чашок Петрі інкубують при t – 25° С (для непатогенних криптококів). Колонії в перші дні випуклі, сметаноподібні, з часом колір змінюється до інтенсивно коричневого. Для визначення уреазної активності криптокока культуру висівають на середовище Христіансена.

Склад середовища Христіансена:

1 г пептону, 1 г глюкози, 5 г NaCl , 2 г дигідрофосфата калію, 15 г агару, дистильована вода до 1 л, рН –6,8. У готове середовище додають 0,2 % фенолового червоного в 50 % етиловому спирті. Розливають в пробірки по 4,5 мл, стерилізують при температурі 115° С 10 хв. В кожен пробірку з розплавленим і охолодженим до 40° С середовищем додають по 0,5 мл 20 % сечовини. Культуру засівають по верхні середовища, інкубують при 25 – 27 ° С.

Облік результатів через 2–3 доби. При наявності криптокока неоформонс середовище забарвлюється в червоний колір. Для ідентифікації *Cryptococcus neoformans* від непатогенних криптококів використовується картопляно-морквяне середовище, 200 г лушпиння картоплі та морккви кип'ячать в 1 л дистильованої води на протязі 1 години, фільтрують через марлю і доводять до 1 л дистильованою водою, додають 5 г глюкози і 15 г агару. Стерилізують при температурі 110° С протягом 15 хв. В охолоджене до 55° С середовище додають 1 мл 6 % тіаміну і 500 мг стрептоміцину.

Посіви інкубують при 28° С. Колонії *Cryptococcus neoformans* мають коричневий колір, сапрофіти не мають кольору.

СЕРОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ: метод латекс-аглютинації для визначення антигену криптокока виконуються згідно з вказівками інструкції до діагностичного набору.

2.4.3. АСПЕРГИЛЬОЗ – збудник гриби роду *Aspergillus*

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: харкотиння, промивні води бронхів, гайморових пазух, ліквору, сечі, фекалій, плевральної рідини, шкірні та нігтьові часточки, виділення з вуха, кров, біоптати тканин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ: світлова мікроскопія.

Мікроскопічне дослідження нативного препарату:

окремі патологічні частинки переносять на предметне скло, покривають покривним скельцем і дивляться при малому та великому збільшенні. Препарати з ліквору, крові, промивних вод, сечі і т.д. центрифугують 1500 об./хв. 5 хвилин. Осад переносять на предметне скло в краплю 10 % гідроокису калію, покривають покривним склом і мікроскопують.

При мікроскопії нативного препарату виявляють ланцюжки конідій, фрагменти міцелію, конідієносці.

МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРБОВАНОГО ПРЕПАРАТУ:

з метою виготовлення пофарбованого мазка, матеріал розподіляють тонким мазком на предметному склі, фіксують в суміші Нікіфорова або над полум'ям пальника, фарбують за Грамом, мікро-

скопують під імерсією в світлову мікроскопі. При мікроскопії фарбованих препаратів виявляємо гіфи міцелію, конідієносці. В гістологічних препаратах можна виявити розгалужений міцелій, інколи конідії та конідієносці.

БАКТЕРІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ: патологічний матеріал засівають на мікологічні середовища: Сабуро, сусло-агар з додаванням 100–200 од/мл пеніциліну, стрептоміцину, левоміцетину. Засіяні чашки Петрі інкубують при температурі 37°С 2–3 дні, передивляються і при виявленні спороношення вивчають культуру гриба.

Метод посіву:

1. Кров досліджують в 2–3 повторях. Засівають кров у співвідношенні 1:10 на рідке середовище Сабуро. Інкубують при температурі 37°С або 28°С протягом 10 днів. Перший висів через 5 днів, другий через 10 днів. Для ідентифікації використовують макроморфологічні культуральні властивості та мікроморфологію грибів. Мікроморфологію вивчають по нативних препаратах під малим та великим збільшенням світлового мікроскопа.
2. Фекалії розводять 1:10 фізіологічним розчином, відстоюють і засівають надосадову рідину 0,1 мл на поверхню твердого поживного середовища.
3. Виділення з вух, зів, носа, статевих органів, взяті стерильним тампоном, засівають, проводячи тампоном по поверхні твердого середовища, обертаючи тампон з усіх боків.
4. Шкірні та нігтьові часточки засівають, притискаючи їх до поверхні середовища.
5. Ліквор засівають на тверде поживне середовище по 0,1 мл і 1:5 на рідке середовище Сабуро (середовище збагачення), флакони з засівом на середовище збагачення інкубують при температурі 28°С до 10 днів з висівом на 3-й, 7-й, 9-й день інкубації.
6. Біоптати тканин засівають на чашки, торкаючись відбитками зрізів до поверхні твердого середовища.

У роду *Aspergillus* конідієносці здебільше не розгалужені, несептовані і мають на кінцях здуття у вигляді куль на поверхні яких лежать тісним шаром циліндричні клітини-стеригми, кожна несе

на собі ланцюжок конідій (спор), за рахунок чого утворюється кулеподібна голівка конідію.

Голівка може бути радіальною, коли стеригми і ланцюжки конідій розходяться радіально і не радіально, коли стеригми знаходяться тільки на верхівці кулі, стиснуті догори. Міцелій та конідієносці не мають кольору, конідії забарвлені у світлі тони, колір колоній залежить від кольору маси конідій.

Характеристика деяких патогенних грибів роду *Aspergillus*

Aspergillus fumigftus

колонії гладенькі, зелені з різними відтінками. Конідієносці гладенькі, кінцеві здуття зворотно–пляшко-видні, несучі стеригми тільки у верхній половині. Кожна стеригма розділяє ланцюжок конідій. Гриб термофільний, добре росте при температурі 37°С.

Aspergillus niger

колонії гладенькі, міцелій білий або жовтий, спороносна зона колоній від темно-фіолетового до чорного кольору. Конідієносці гладенькі, безбарвні, кулясті.

Aspergillus flavus

колонії жовто-зеленого кольору, конідієносці жовті, шорсткі. Здуття кулеподібне, голівки не радіальні. Стеригми одноядерні в малих голівках і двоядерні у великих голівках. Конідії грушоподібні або круглі.

Aspergillus nidulans

колонії шовковисті, зворотний бік колоній має червоно-бурий колір, конідієносці бурі, гладенькі. Здуття грушоподібної форми. Стеригми двурядні, конідії кулеподібні, гладенькі, зеленого або оливкового кольору.

СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ (ІФА): антитіла до збудника аспергильозу в сироватці крові в нормі не виявляють. При серологічному дослідженні методом ІФА антитіла класу IgG до антигенів **Aspergillus** виявляються в сироватці крові в більшості інфікованих і практично у всіх хворих, в

легенях яких при рентгенологічному дослідженні виявлено грибовий «шар» (приблизно 90 % випадків). Тест специфічний. Рівень антитіл досліджується в динаміці. Для захворювання характерне наростання рівня антитіл (7,12,16)

2.4.4. ГІСТОПЛАЗМОЗ – збудник *Histoplasma capsulatum*

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ: харкотиння, біопунктати печінки, селезінки, шкіри, лімфовузлів.

МЕТОД МІКРОСКОПІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ: при фарбуванні мазка методом Романовського-Гімза гістоплазми забарвлюються в синій колір, цитоплазма – в темно-синій колір. В пофарбованих препаратах виявляються дрібні дріжджоподібні утворення, розміщені в клітинах ретикуло-ендотеліальної системи і поза ними.

КУЛЬТИВУВАННЯ матеріалу проводять на мікологічні середовища – Сабуро, сусло-агар. Для одержання міцелярної форми колоній культури вирощують при t 25° – 30° С, ріст уповільнений (10–14 днів). На середовищі виростають білі, пухнасті колонії, з часом стають коричневими, по периферії плоскі. При мікроскопії виявляють тонкий міцелій, мікроконідії, які сидять на тонкій ніжці. Конідії мають вигляд грушоподібний або овальний.

СЕРОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ: реакція зв'язування комплекменту, реакція імунодифузії, латексаглютинація з гістоплазміном і антигеном дріжджоподібних клітин, шкірна проба. Виконуються згідно з інструкцією до набору.

3. ЛАБОРАТОРНИЙ МОНІТОРИНГ ЗА АНТИРЕТРОВІРУСНОЮ ТЕРАПІЄЮ У ХВОРИХ НА ВІЛ/СНІД

Антиретровірусна терапія (АРТ) призначена для специфічного лікування ВІЛ-інфекції і спрямована на максимальне пригнічення реплікації ВІЛ в організмі. Як наслідок АРТ призводить до відновлення клітин імунної системи, покращання клінічного стану хворого та продовження тривалості життя.

Проведення лабораторного моніторингу є невід'ємним компонентом надання медичної допомоги людям з ВІЛ/СНІДом, яке спрямоване на запобігання тяжким і загрозливим для життя ускладненням.

Антиретровірусну терапію призначають на основі лабораторних або клінічних показників, відповідно до класифікації ВООЗ.

До лабораторних показників відносяться: кількість СД4⁺-клітин/мкл крові хворого або, якщо визначити її неможливо, загальна кількість лімфоцитів, а також рівень вірусного навантаження (ВН).

До клінічних показників – клінічні прояви ВІЛ-інфекції у формі розвитку опортуністичних інфекцій, уражень нервової системи, онкологічні захворювання. При оцінці стану хворого на ВІЛ-інфекцію перевага надається такому показнику, як кількість СД4⁺-лімфоцитів.

| Стадія ВІЛ-інфекції | Кількість СД4 ⁺ -лімфоцитів (клітин/мкл) | Загальна кількість лімфоцитів (клітин/мкл) | Вірусне навантаження (РНК ВІЛ копій/мл)* | Проведення АРТ |
|----------------------------------|---|--|--|----------------|
| I - безманіфестне носійство, ПЛІ | незалежно | незалежно | незалежно | не проводиться |
| I, II, III | 350 - 200 | > 1200 | > 55 000 | пропонується |
| I, II, III | < 200 | < 1200 | незалежно | проводиться |
| IV, СНІД | незалежно | незалежно | незалежно | проводиться |

* Визначення ВН методом ЗТ-ПІІР (полімеразна ланцюгова реакція з поперднім етапом зворотної транскрипції).

Моніторинг ефективності антиретровірусної терапії здійснюється за такими показниками:

- клінічне спостереження;
- імунологічний стан (визначення кількості CD4⁺-лімфоцитів);
- вірусологічна відповідь на АРТ (визначення рівня ВІІ).

Основні рекомендовані тести проводяться для оцінки ефективності антиретровірусної терапії і включають визначення загальної кількості лімфоцитів, кількості CD4⁺-лімфоцитів; моніторинг гепатотоксичності та оцінку ниркової функції. Визначення кількості CD4⁺-лімфоцитів вважається пріоритетним, як найкращий показник імунної реакції організму на терапію.

Тестування на вірусне навантаження вважається обов'язковим через труднощі, пов'язані з вартістю дослідження, але це важливий показник, який дозволяє своєчасно оцінити ефективність антиретровірусних препаратів і визначити ризик формування резистентних форм вірусу.

3.1. ОЦІНКА ІМУНОЛОГІЧНОГО СТАНУ ВІІ-ІНФІКОВАНИХ

Оцінка імунологічного стану проводиться шляхом визначення кількості CD4⁺-лімфоцитів в 1 мкл крові. Рівень CD4⁺-лімфоцитів обумовлює ступінь розвитку імунодефіциту, стадію захворювання і, таким чином, дозволяє прийняти рішення щодо початку антиретровірусної терапії і профілактики опортуністичних інфекцій. Цей показник також є імунологічним критерієм оцінки ефективності АРТ.

У разі неможливості визначення кількості CD4⁺-лімфоцитів, слід визначити загальну кількість лімфоцитів (TCL) (альтернативний тест).

Кількість CD4⁺-лімфоцитів визначається методом проточної цитометрії, який є максимально стандартизованим і дозволяє оцінити імунний стан ВІІ-інфікованого пацієнта. Основою методу є специфічне зв'язування поверхневих антигенів клітин крові з моноклональними антитілами, які кон'юговані з флуоресцентною міткою. При застосуванні проточних цитометрів відкритого типу використовують реагенти (моноклональні антитіла) будь-якого виробника. Реагенти повинні мати сертифікат якості і бути зареєстровані в Україні.

Матеріал для дослідження:

Для дослідження використовують цільну кров, яку відбирають стерильно, в спеціальні системи для забору крові (вакутайнери, моновети). При використанні гепарину як антикоагулянту, кров придатна для проведення аналізу протягом 48 годин при її зберіганні в умовах кімнатної температури. У разі використання K₃ ЕДТА як антикоагулянту, кров придатна для аналізу протягом 4 годин після її отримання. На пробірці позначають дату, час забору крові і ідентифікаційний код пацієнта.

Транспортування зразка: зберігання і транспортування зразка здійснюють в температурному режимі 18–24° С. Збільшення температури до 37° С призводить до клітинної деструкції і робить неможливим подальші гематологічні і імунофенотипові дослідження.

Перелік необхідного обладнання:

- центрифуга лабораторна на 3000 об./хв.;
- струшувач типу «Вортекс»;
- 1 комплект автоматичних дозаторів і наконечників до них:

| | |
|--------------|-------|
| 0,5–10 мкл | 1 шт; |
| 5–50 мкл | 1 шт; |
| 50–200 мкл | 1 шт; |
| 200–1000 мкл | 1 шт. |

- степпер – автоматичний дозатор, призначений для багатократного дозування однакових об'ємів розчинів;
- штативи для пробірок 12x75 мм;
- штатив для дозаторів (на 5 місць);
- комплект лабораторного мірного посуду;
- дистильатор;
- холодильник на +4° С;
- бак для утилізації інфекційного матеріалу.

Всі дослідження проводяться лише разовими наконечниками.

Панелі моноклональних антитіл для дослідження імунного статусу ВІЛ-інфікованих пацієнтів:

Двоколірні панелі моноклональних антитіл CD45/CD14 – визначення лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів;

CD3/CD4 – визначення CD4⁺-лімфоцитів;

CD3/CD8 – визначення CD8⁺-лімфоцитів;

CD3/CD19 – визначення CD19⁺-лімфоцитів.*

Триколірні панелі моноклональних антитіл

CD3/CD4/CD45 – визначення CD4⁺-лімфоцитів;

CD3/CD8/CD45 – визначення CD8⁺-лімфоцитів.

CD3/CD19/CD45 – визначення CD19⁺-лімфоцитів.*

Результати дослідження отримують у відносних показниках. При необхідності одержання абсолютних величин проводять перерахування відносних значень відносно до показника загальної кількості лімфоцитів, яка визначена попередньо в гематологічному дослідженні.

Альтернативні технології:

Тест-система «CD4⁺ for count by manual» фірми «Coulter Beckman». Кров на К₃ ЕДТА інкубується з антитілами CD4⁺, які кон'юговані з латексними мікросферами. Облік результатів здійснюється в гемоцитометрі.

Методом одноетапного ІФА з використанням тест-систем «TRAX CD4», «Carpellia». Зразок суцільної крові змішують з суспензією парамагнітних часток, покритих антитілами до рецептора CD3⁺. Суміш вносять у лунки мікропланшета і встановлюють на магнітну рамку. Після видалення залишків плазми і клітин, що не прикріпилися, у лунки вносять мічені пероксидазою специфічні анти-CD4⁺ або анти-CD8⁺ моноклональні антитіла. Облік результатів проводять на спектрофотометрі при довжині хвилі 450–620 нм.

* додатковий показник, який рекомендовано при обстеженні дітей.

Визначення CD4⁺-лімфоцитів методом люмінесцентної мікроскопії.

В умовах, коли неможливо визначити рівень CD4⁺-лімфоцитів як критерій для призначення антиретровірусної терапії, використовують показник загальної кількості лімфоцитів (TCL) – 1200 клітин/мкл. Хоча встановлено, що загальна кількість лімфоцитів не завжди корелює з кількістю CD4⁺-клітин, але в поєднанні з клінічними симптомами цей показник є корисним маркером щодо прогнозу хвороби. Для пацієнтів, які не мають клінічних проявів СНІДу, в першу чергу визнається показник загальної кількості лімфоцитів. Якщо він менше 1200 клітин/мкл, кров пацієнта необхідно тестувати на визначення кількості CD4⁺-лімфоцитів для підтвердження результату аналізу і прийняття рішення щодо АРТ.

Значення.

Зниження або збільшення кількості CD4⁺-лімфоцитів вважається достовірним, якщо різниця дорівнює 30 % від початкового для абсолютного показника і понад 3 % від початкового рівня для відносного числа клітин.

При відсутності терапії кількість CD4⁺-лімфоцитів знижується в середньому на 4 % у рік на кожний log₁₀ РНК ВІЛ.

Періодичність тестування.

Обстеження проводять кожні 6 місяців для пацієнтів, які знаходяться на стадії вірусносійства. При зниженні кількості лімфоцитів до 350 клітин/мкл – кожні 3 місяці.

Періодичність обстеження щодо визначення CD4⁺-лімфоцитів для диспансерних пацієнтів:

| Кількість CD4 ⁺ -лімфоцитів/клітин/мкл | Періодичність обстеження |
|---|--------------------------|
| > 500 | 1 раз на рік |
| 350-500 | 2 рази на рік |
| від 350 та нижче | 4 рази на рік |

Перед початком призначення АРТ проводиться визначення CD4⁺-лімфоцитів, але не пізніше ніж за 2 тижні до початку лікування. Пацієнтів, які знаходяться на антиретровірусній терапії, обстежують кожні 3 місяці. В разі необхідності лікар може призначити таке обстеження частіше.

Рівень CD4⁺-лімфоцитів збільшується на ≥ 50 клітин/мкл через 4–8 тижнів після пригнічення реплікації вірусу за допомогою АРТ, а потім на 50–100 клітин/мкл у рік для дорослих. При відміні терапії рівень CD4⁺-лімфоцитів швидко знижується, до 100–150 клітин/мкл через 12–16 тижнів.

Якщо результати аналізу не відповідають попереднім тенденціям, аналіз необхідно повторити.

Відповідно до керівних принципів ВООЗ на початку терапії або заміні схеми терапії рівень CD4⁺-лімфоцитів (як і вірусне навантаження) рекомендують досліджувати через 4, 8–12 і 16–24 тижні від початку терапії.

Фактори, що впливають на рівень CD4⁺-лімфоцитів:

1. Аналітична варіативність призводить до значного розбіжності нормальних значень (приблизно 500–1400 кл/мкл), оскільки показник CD4⁺-клітин залежить від трьох факторів: кількості білих кров'яних тілець, відсотка лімфоцитів і відсотка клітин з рецептором CD4⁺.
2. Добові коливання з найменшим значенням о 12:30 і піковим значенням о 20:30.
3. Незначне зниження рівня CD4⁺-лімфоцитів спостерігається при значних хірургічних операціях та гострих інфекціях.
4. Призначення кортикостероїдів призводить до значного зниження рівня CD4⁺-лімфоцитів з 900 клітин/мкл до 300 клітин/мкл.
5. Хибно високий рівень CD4⁺-лімфоцитів спостерігається при коінфекції HTLV-1 та вилученій селезінці.

3.2. КІЛЬКІСНИЙ ВМІСТ РНК ВІЛ У ПЛАЗМІ КРОВІ (ВІРУСНЕ НАВАНТАЖЕННЯ)

Показником кількісного вмісту ВІЛ в плазмі крові є так зване «вірусне навантаження», яке відображає активність реплікації ВІЛ в організмі та пов'язану з нею швидкість руйнування лімфоцитів CD4⁺.

Термін «вірусне навантаження» іноді використовується для позначення кількості ВІЛ в усіх органах і рідинах організму. Однак на практиці вірусне навантаження (ВН) частіше за все використовується для позначення кількісного вмісту вірусу в плазмі крові і визначається за допомогою підрахунку кількості копій РНК ВІЛ в плазмі.

Рівень ВН дозволяє оцінювати ризик прогресування ВІЛ-інфекції. Підвищення рівня ВН є несприятливою ознакою перебігу захворювання і потребує негайного призначення АРТ. У разі підвищення рівня ВН у пацієнтів, які проходять лікування АРТ, необхідно визначити резистентність штамів ВІЛ у такого пацієнта, оскільки підвищення рівня ВН може бути пов'язано з формуванням резистентних до препаратів штамів, що використовують для лікування.

ВН – це важливий лабораторний критерій для прийняття рішення щодо початку АРТ, контролю її ефективності, та своєчасної зміни схеми терапії.

Саме тому визначення рівня ВН ВІЛ вважається важливим показником при проведенні лікування ВІЛ-інфікованих і дозволяє контролювати ефективність дії препаратів.

Методи визначення рівня вірусного навантаження

1. Визначення рівня вірусного навантаження за методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Об'єктом дослідження є плазма крові ВІЛ-інфікованих пацієнтів. Кров відбирається стерильно в спеціальні системи для забору крові (вакутайнери, моновети) з використанням ЕДТА як антикоагулянту.

Гепарин інгібує ПЛР, тому для забору крові його не використовують (як наслідок - результат реакції може бути хибно негативний).

Полімеразна ланцюгова реакція є надзвичайно чутливим і специфічним методом, який дозволяє виявляти геномні послідовності вірусної РНК або провірусної ДНК. Висока чутливість методу вимагає дотримання певних умов: обов'язково повинно бути наявні три окремі приміщення, відмінна якість тест-систем, кваліфікований персонал.

Необхідне обладнання для проведення ПЛР:

- ампліфікатор;
- ламінарна шафа з вертикальним потоком повітря, II класу безпеки;
- бокс для ПЛР;
- лабораторна центрифуга до 3000 об./хв.;
- центрифуга до 14 000 об./хв. для пробірок типу «Епендорф»;
- мікроцентрифуги-вортекси (для перемішування реакційної суміші);

- автоматичні дозатори змінного об'єму 1-канальні:
 - 0,5–10 мкл – 2 шт;
 - 5 – 50 мкл – 3 шт;
 - 50–200 мкл – 2 шт;
 - 200–1000 мкл – 2 шт;
- 8-канальні дозатори на 50 – 200 мкл – 5 шт.
- комплект обладнання для проведення імуноферментного аналізу (використовується для реєстрації результатів ПЛР):
 - інкубатор для мікропланшет;
 - промивач для мікропланшет;
 - спектрофотометр для мікропланшет (ридер);
 - штативи для автоматичних дозаторів, штативи для пробірок на 2,0 мл і 0,2 мл;
 - пробірки на 2,0 та 1,5 мл поліпропіленові, конічні, з маркірувкою «оброблені проти РНК-аз та ДНК-аз»;
 - пробірки 0,2 мл;
 - наконечники для автоматичних дозаторів з фільтрами, різного об'єму, оброблені проти РНК-аз;
 - дезінфікуючі засоби;
 - 70 % етиловий спирт;
 - ізопропіловий спирт;
 - гумові рукавички;

- Перший етап – виділення РНК з плазми крові.
- Другий етап – зворотна транскрипція з наступною ампліфікацією (специфічне розмноження геномної послідовності вірусу).
- Облік результатів (третій етап) проводять імуноферментним методом. Кількість копій РНК ВІЛ в 1 мл підраховується співвідношенням оптичної щільності ампліфікату до оптичної щільності внутрішнього стандарту.

Рівень вірусного навантаження визначають за допомогою тест-системи фірми «Roche» «Amplicor HIV-1 Monitor Test», що мають дві версії (1.0 та 1.5). Версія 1.0 переважно виявляє субтип В ВІЛ-1, версія 1.5 виявляє всі субтипи ВІЛ-1.

Об'єкт дослідження: плазма крові у кількості 0,2 - 0,5 мл.

Цільну кров зберігають при температурі +2–8° С не більше 6 годин. Плазму отримують центрифугуванням при 800 – 1600 g протягом 20 хв. при кімнатній температурі; до проведення аналізу плазма може зберігатись при +4°С до 24 годин.

Транспортують плазму при температурі +4°С 24 години, для тривалого зберігання заморожують при – 20°С. На пробірці позначають дату, час забору крові і ідентифікаційний код пацієнта.

Динамічний діапазон тест-системи (межі значень, в яких дослідження проходить коректно) – 400 – 750 000 копій/мл. У разі, якщо отримане значення нижче ніж 400 копій/мл, результат дослідження трактується як: **< 400 копій/мл**; при отриманні значення, яке перевищує 750000 копій/мл, результат дослідження трактується як: **> 750000 копій/мл** (так позначається результат аналізу у довідці).

Примітка.

Слід зазначити, що визначення рівня вірусного навантаження з метою призначення антиретровірусної терапії, моніторингу ефективності АРТ було затверджено Управлінням по продуктах харчування і лікарських препаратах США (FDA) тільки з використанням тест-системи «Amplicor HIV-1 Monitor Test версія 1.5» (фірма Roche).

Аналогічний підхід для кількісної оцінки вмісту РНК ВІЛ було використано фірмою «Амплісенс» (Росія) у створенні набору реагентів «ВІЧ-1 Монитор тест». Набір реагентів призначено для науково-дослідних цілей. Вимоги для проведення дослідження аналогічні попередньому пункту.

Необхідний об'єм проби – 0,1 мл. Динамічний діапазон набору реагентів: 400 – 750 000 копій РНК ВІЛ/мл.

2. Гібридизація ДНК за допомогою розгалуженого зонда або вДНК (Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay, Bayer;). Виявляє всі субтипи ВІЛ-1.

Динамічний діапазон: 75 - 500 000 копій/мл.

Необхідний об'єм проби: 1 мл.

Вимоги: кров відбирається в пробірки з ЕДТА. Плазма має зберігатись не більше 4 годин при 4° С, перед транспортуванням заморожується при –20°С.

Послідовна ампліфікація на основі повного геному (NASBA) (NucliSens HIV-1 QT «bioMerieux»). Виявляє всі субтипи ВІЛ-1. Може використовуватись для аналізу вірусного навантаження в усіх тканинах і рідинах організму.

Динамічний діапазон: 176 – 3 500 000 копій/мл
Необхідний об'єм проби: від 0,01 мл до 2 мл залежно від матеріалу.

Вимоги: використовується цільна кров, кров з ЕДТА та кров з гепарином. Аналізуватись може будь-яка рідина організму. Сироватку і плазму зберігають < 4 годин, перед транспортуванням заморожують при -20°C .

Тест-набори та обладнання для проведення досліджень повинні мати відповідні сертифікати про їх реєстрацію в Україні.

Показання для призначення аналізу на визначення ВІЛ. Його проводять з метою:

- **лабораторного моніторингу перебігу ВІЛ-інфекції:** у хворих, які не отримують терапії, рівень РНК ВІЛ в плазмі крові визначається на момент встановлення діагнозу і в подальшому рекомендується кожні 6 місяців;
- **моніторингу лікування:** після початку АРВ терапії спостерігається швидке зниження рівня РНК ВІЛ протягом 1–4 тижнів (α -спад), що є наслідком активності АРВ-препаратів, спрямованих на віріони ВІЛ, які вільно циркулюють в плазмі крові. Надалі відбувається друге зниження вірусного навантаження (α -спад), більш тривале (місяці, роки), яке відображає активну дію препаратів на інфіковані ВІЛ макрофаги і дендритні клітини лімфатичних фолікулів. Максимальний противірусний ефект спостерігається на 4–6 місяць. Більшість спеціалістів вважає, що рівень РНК ВІЛ (тобто кількість копій РНК в 1 мл плазми) це найважливіший барометр терапевтичної відповіді на ВААРТ. Згідно з аналізом 12 лабораторій, є незначні розбіжності в рівні вірусного навантаження у чоловіків і жінок: в середньому рівень ВІЛ \approx в 2 рази ($0,23 \log_{10}$ копій/мл) нижче у жінок, ніж у чоловіків. Однак ці відмінності відсутні при рівні CD4^+ -лімфоцитів < 300 кл/мкл і не можуть впливати на рішення стосовно призначення терапії;
- **визначення гострої стадії ВІЛ-інфекції:** визначення рівня РНК ВІЛ в плазмі використовують для виявлення гострого ретровірусного синдрому в ранній період інфекції до початку сероконверсії. Більшість дослідників вказують на високі рівні концентрації вірусу (10^5 - 10^6 копій/мл) у цей період;

- **визначення прогнозу розвитку хвороби:** вірусне навантаження корелює зі швидкістю зменшення кількості CD4^+ -лімфоцитів і є важливим прогностичним показником на ранній стадії захворювання, який дозволяє оцінити ризик розвитку СНІДу;
- **визначення ризику опортуністичних інфекцій:** кількість CD4^+ -лімфоцитів – кращий показник для прогнозування розвитку СНІД-обумовлених ускладнень, проте саме вірусне навантаження дозволяє передбачити швидкість зниження рівня CD4^+ -лімфоцитів;
- **встановлення можливості передачі ВІЛ:** можливість передачі ВІЛ при будь-якому контакті прямо корелює з вірусним навантаженням;
- **оцінки ризику трансмісії ВІЛ від матері до дитини:** дослідження показали, що рівень вірусного навантаження прямо пропорційний ступеню ризику передачі ВІЛ від матері до дитини.

Терапевтичний моніторинг.

У хворих, які отримують лікування, вірусне навантаження визначається безпосередньо на початку антиретровірусної терапії і через 2–8 тижнів після її початку. Друге визначення дозволяє клініцисту провести оцінку вихідної ефективності терапії, оскільки у більшості хворих при належному дотриманні режиму приймання антиретровірусної терапії за цей час призводить до значного зниження вірусного навантаження (приблизно на $0,75 - 1 \log_{10}$ копій/мл). Протягом наступних тижнів вірусне навантаження продовжує знижуватися та через 16–20 тижнів досягає у більшості хворих невизначених значень (менш ніж 400 копій/мл – межа чутливості тест-системи). Неможливість знизити рівень вірусного навантаження на $1 \log_{10}$ копій/мл до 8 тижня від початку АРТ вважається вірусологічною невдачею і потребує аналізу причин та оцінки можливості зміни схеми АРТ. Ефективність ВААРТ оцінюють у \log_{10} . Для цього отриманий результат, виражений у копіях РНК ВІЛ в 1 мл плазми, перераховують у \log_{10} згідно з математичною таблицею десяткових логарифмів.

Достовірним вважається трикратна зміна рівня вірусного навантаження в плазмі крові ($0,5 \log_{10}$) в бік збільшення або зменшення.

Швидкість зниження вірусного навантаження залежить від початкового рівня віремії, початкової кількості CD4^+ -лімфо-

цитів, ефективності схеми терапії, дотримання режиму приймання препаратів (прихильності пацієнта), попередньої історії застосування АРТ, наявності опортуністичних хвороб.

Зменшення рівня вірусного навантаження нижче 400 копій/мл пов'язано з повним і стійким пригніченням вірусної реплікації, проте слід зазначити, що навіть при цьому рівні вірусного навантаження в організмі постійно продовжується реплікація вірусу, але не в значній кількості.

У випадку, коли РНК ВІЛ продовжує визначатись в плазмі після 16–20 тижнів від початку терапії, проводять спостереження за розвитком хвороби в динаміці і розглядають можливість зміни схеми лікування.

Визначення рівня вірусного навантаження з метою моніторингу ефективності АРВ терапії проводять **кожні 6 місяців**. Дослідження проводяться в періоди клінічної стабільності щодо опортуністичних інфекцій та не менш ніж через 4 тижні після щеплення чи випадкових (інтеркурентних) інфекцій з використанням однієї лабораторії та технології.

Фактори, що впливають на зростання рівня вірусного навантаження:

1. Прогресія хвороби.
2. Невдача антиретровірусної терапії внаслідок неадекватної ефективності препаратів; неадекватного рівня вмісту, застосування препаратів в організмі; недотримання режиму лікування; формування резистентних штамів вірусу.
3. Наявність активних опортуністичних і випадкових (інтеркурентних) інфекцій.
4. Щеплення, в цьому випадку збільшення вірусного навантаження незначне і коливається від 2 до 4 тижнів.

Хибно низьке вірусне навантаження спостерігається при:

1. Інфікованості ВІЛ-2.
2. Одночасному інфікуванні ВІЛ-1 та ВІЛ-2.
3. Використанні тест-системи «Amplacor HIV-1 Monitor Test версія 1.0» для інфікованих не-В субтипами ВІЛ-1.
4. Порушенні правил забору крові (використання як антикоагулянту гепарину).
5. Некоректному зберіганні та транспортуванні зразка крові або плазми.

3.3. ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО АНТИРЕТРОВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

Однією з найважливіших причин неефективності антиретровірусної терапії є виникнення резистентності ВІЛ, яке проявляється у спроможності вірусу активно репродукуватися в присутності застосованих препаратів. У пацієнтів, які отримують антиретровірусну терапію, розповсюдженість ≥ 1 крупної мутації становить приблизно 50 %. Частота такої мутації у пацієнтів, які не отримують терапію, становить 5 – 20 %. Аналіз на резистентність є важливим компонентом лікування ВІЛ-інфекції.

Тестування на наявність резистентності до антиретровірусних препаратів проводиться на центральному рівні, в референс лабораторії або науково-дослідному закладі.

ВООЗ рекомендує країнам, які планують застосування програм антиретровірусної терапії, одночасно застосовувати систему контрольного нагляду за резистентністю ВІЛ. Це дозволить виявляти потенційну резистентність до лікарських засобів на рівні популяції і, таким чином, своєчасно змінювати рекомендовані схеми лікування.

Лікарська резистентність проявляється:

- зростанням вірусного навантаження у плазмі крові;
- посиленням імуносупресії;
- клінічним прогресуванням хвороби.

Показання щодо визначення резистентності

Аналіз на резистентність до АРТ препаратів проводять у пацієнтів з хронічною ВІЛ-інфекцією у випадках, якщо:

- рівень вірусного навантаження впродовж 4 тижнів терапії не вдалося знизити більш ніж на $0,5-0,7 \log_{10}/\text{мл}$;
- рівень вірусного навантаження впродовж 8 тижнів лікування не знизився більш ніж на $1 \log_{10}/\text{мл}$;
- рівень вірусного навантаження після 16–20 тижнів терапії перевищує 1000 копій РНК/мл.

Тестування не рекомендовано:

- ✓ при хронічній ВІЛ-інфекції до початку АРВ терапії;
- ✓ після припинення приймання АРВ препаратів;
- ✓ у випадку, якщо вірусне навантаження нижче 1000 копій РНК ВІЛ/мл (результат дослідження буде недостовірний).

Лікарська резистентність може носити генотиповий і фенотиповий характер. Генотипова резистентність характеризується появою в геномі вірусу мутацій – точкових або множинних, що зумовлює фенотипову резистентність. Фенотипова резистентність характеризується можливістю репродукції вірусу в присутності АРВ препарату, така зміна чутливості виявляється *in vitro* (в культурі лімфоїдних клітин).

Резистентним вважається штам, у якого чутливість до АРВ препаратів знижена в 4 рази в порівнянні з диким штамом ВІЛ.

Методи визначення резистентності.

Генотипові тести: аналіз генотипу виявляє мутації, що пов'язані з фенотиповою стійкістю (резистентністю). Генотиповий тест засновано на аналізі мутацій у генах, які кодують ферменти вірусу: зворотну транскриптазу і протеазу. Такі тести значно відрізняються від фенотипових по вартості, кількості мутацій, що виявляються, простоті і точності результатів.

Переваги тесту:

- значно дешевший за фенотиповий;
- можливість отримання результатів достатньо швидко (через 1–2 тижні);
- дозволяє виявляти мутації до того, як вони призведуть до фенотипової резистентності.

Недоліки тесту:

- виявляє стійкість тільки домінуючих штамів (>20%);
- потребує певної кваліфікації інтерпретація результатів (трактування результату дослідження засноване на знанні генотипів, мутацій, і оцінки імовірності виникнення перехресної резистентності до інших препаратів тієї ж групи);
- якість аналізу залежить від кваліфікації фахівця, який проводить аналіз;
- може суперечити фенотипу;
- потребує високого вірусного навантаження (не менш 1000 копій РНК/мл).

Фенотипові тести: фенотиповий аналіз виявляє спроможність ВІЛ до реплікації при різних концентраціях препаратів, що тестуються. Тест вимірює чутливість до окремих препаратів, але не до їх комбінацій. Реплікацію ВІЛ враховують при різних концентраціях препарату, результати виражають в одиницях ІС (inhibitory concentration) і порівнюють з еталонним штамом вірусу. Співвідношення величин ІС еталонного штаму і вірусів, що тестувались, називають ступенем

резистентності. Тест схожий з традиційними тестами *in vitro* на антимікробну чутливість.

Переваги тесту:

- дозволяє оцінити загальний ефект резистентності, у тому числі множинні мутації і мутаційні взаємодії;
- є простішим у виконанні, ніж генотиповий;
- інтерпретація тесту не потребує спеціальної кваліфікації дослідника і аналогічна аналізу на антимікробну чутливість.

Недоліки тесту:

- дорожчий у порівнянні з генотиповим;
- результати отримують через 2–3 тижні;
- виявляє стійкість до окремих препаратів, але не до їх комбінацій;
- виявляє резистентність тільки у домінуючих штамів (>20%);
- вірусне навантаження повинно бути не менш 1000 копій РНК/мл.

Віртуальний фенотип: моделювання фенотипу штаму, який тестується, на основі аналізу генотипу. Паттерн мутацій тестованого штаму порівнюється з результатами фенотипового аналізу штамів, що демонструють аналогічні мутації.

Обмеження тестів на виявлення резистентності

1. Аналіз на стійкість, перш за все, визначає препарати, які необхідно уникати, і з меншою вірогідністю визначає препарати, які можуть бути активні.

2. Аналіз має проводитись в присутності антиретровірусного препарату, який викликає підозру на розвиток резистентності, оскільки перерва терапії призводить до швидкого розмноження натурального типу вірусу, який починає перебільшувати за чисельністю резистентні штами. Час між припиненням приймання ВААРТ і зміною резистентних штамів на натуральний вірус знаходиться в значних межах, від кількох днів до тижнів у випадку стійкості до ЗТС, від кількох тижнів до місяців у разі стійкості до інгібіторів протеази, і від кількох місяців до декількох років для деяких мутацій стійкості до ННІЗТ і аналогів тимідину.
Загальна рекомендація – аналіз повинен проводитись, коли пацієнт знаходиться на терапії або в межах 2 – 3 тижнів після її відміни.

3. Викликає труднощі інтерпретація результатів у пацієнтів, які раніше приймали антиретровірусну терапію. Важ-

ливим фактором при виборі схеми лікування є попередня історія застосування препаратів.

4. Рівень вірусного навантаження має бути не менш 1000 копій РНК ВІЛ/мл.

5. Точність тестів залежить від кількості попередніх схем лікування, які застосовував пацієнт.

3.4. ДІАГНОСТИКА ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ

Наявність у дітей материнських антитіл до ВІЛ IgG не дозволяє встановити діагноз за методом ІФА в перші 18 місяців життя.

Для визначення наявності вірусу в організмі дитини, яка була народжена ВІЛ-інфікованою матір'ю, використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), спрямований на визначення провірусної ДНК або РНК ВІЛ.

Матеріал для дослідження: кров у кількості 5 мл.

Кров відбирається стерильно в спеціальні системи для забору крові (вакутайнери, моновети) з використанням ЕДТА як антикоагулянту. На пробірці позначають дату, час забору крові і ідентифікаційний код пацієнта.

Цільну кров зберігають при температурі +2–8° С не більш 6 годин. Для визначення провірусної ДНК проводять виділення фракції лімфоцитів центрифугуванням в градієнті щільності (фікол–верографін). Для визначення РНК отримують плазму, як було описано вище (в розділі 3.2.).

Гепарин інгібує ПЛР, тому для забору крові його не використовують (як наслідок – результат реакції може бути хибно негативний).

Полімеразна ланцюгова реакція є надзвичайно чутливим і специфічним методом, який дозволяє виявляти геномні послідовності вірусної РНК або провірусної ДНК. Висока чутливість методу вимагає дотримання певних умов: обов'язково повинні бути три окремі приміщення, відмінна якість тест-систем, кваліфікований персонал.

Необхідне обладнання для проведення ПЛР:

- ампліфікатор;
- ламінарна шафа з вертикальним потоком повітря, II класу безпеки;

- бокс для ПЛР;
- лабораторна центрифуга до 3000 об./хв.;
- центрифуга до 14 000 об./хв. для пробірок типу «Епендорф»;
- мікроцентрифуги-вортекси (для перемішування реакційної суміші);
- автоматичні дозатори змінного об'єму 1-канальні:
 - 0,5–10 мкл – 2 шт;
 - 5 – 50 мкл – 3 шт;
 - 50–200 мкл – 2 шт;
 - 200–1000 мкл – 2 шт;
- штативи для автоматичних дозаторів, штативи для пробірок на 2,0 мл і 0,2 мл;
- пробірки на 2,0 та 1,5 мл поліпропіленові, конічні, з маркіровкою «оброблені проти РНК-аз та ДНК-аз»;
- пробірки 0,2 мл;
- обладнання для проведення горизонтального електрофорезу (джерело живлення, камера для електрофорезу, трансільюмінатор, система відеодокументації);
- наконечники для автоматичних дозаторів з фільтрами, різного об'єму, оброблені проти РНК-аз;
- дезінфікуючі засоби;
- 70 % етиловий спирт;
- ізопропіловий спирт;
- гумові рукавички;

- Перший етап – виділення ДНК з лімфоцитів.
- Другий етап – ампліфікація певного фрагмента провірусної ДНК (специфічне розмноження геномної послідовності вірусу).
- Облік результатів (третій етап) – проводять методом горизонтального електрофорезу у 2 % агарозному гелі.

✓ У разі визначення РНК ВІЛ, дослідження проводять так, як було описано вище (в розділі 3.2.).

Алгоритм тестування на наявність провірусної ДНК ВІЛ.

- Перше обстеження на наявність провірусної ДНК ВІЛ методом ПЛР проводять в 1 – 2 місяця життя дитини;
- при отриманні негативного результату проводять друге визначення провірусної ДНК у віці 6 місяців;

- при отриманні позитивного результату проводять аналіз другого зразка крові в термін не пізніше 2 тижнів.
- Друге обстеження на визначення провірусної ДНК ВІЛ, для підтвердження діагнозу, проводять в віці 6 місяців:
 - при отриманні негативного результату – зняття з обліку;
 - при отриманні позитивного результату – підтвердження діагнозу ВІЛ-інфекція.

Чутливість та специфічність ПЛР-аналізу для діагностики ВІЛ-інфекції у дітей перших місяців життя становить:

- до 4 тижнів життя – 93 %;
- з 4 до 8 тижнів – 98 %;
- після 4 місяців приблизно 100 %.

При підозрі на антенатальне інфікування для своєчасного початку ВААРТ бажано перше тестування на наявність провірусної ДНК ВІЛ методом ПЛР проводити через 48 годин після народження (забороняється досліджувати пуповинну кров, оскільки вона може бути забруднена кров'ю матері).

– У разі отримання негативного результату для остаточного встановлення діагнозу у двомісячному віці слід повторити аналіз на виявлення провірусної ДНК ВІЛ.

– Отримання позитивного результату дозволяє встановити попередній діагноз ВІЛ-інфекції. Остаточний діагноз ВІЛ-інфекції встановлюється після отримання повторного позитивного результату ПЛР на наявність ДНК ВІЛ, який проводять при дослідженні другого зразка крові.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Наказ МОЗ України від 25.05.2000 р. № 120 «Про удосконалення організації медичної допомоги хворим на ВІЛ-інфекцію/СНІД».
2. А.Г.Рахманова. ВИЧ-инфекция, клиника, лечение // Санкт-Петербург.-2000г.
3. Е.И.Змушко, Е.С.Белозеров. ВИЧ–инфекция // Санкт-Петербург. - 2000г.
4. Г.И. Козинец, В.В.Высоцкий, В.М. Негорелов, А.А. Ерови-генков, В.А. Малов. Кровь и инфекция. // М. Триада – фарм, 2001г.
5. Навчальний посібник з лабораторної діагностики. ВІЛ –інфекції/СНІДу, навчально-методичний посібник для лікарів // Київ. –1999р.
6. А.Г.Рахманова, Е.Е.Воронин, Ю.А.Фомин. ВИЧ–инфекция у детей // Санкт-Петербург, -2003 г.
7. А.Я.Лысенко, М.Х.Туроянов, М.В.Лавдовская, В.М. Подольский. ВИЧ-инфекция и СПИД – ассоциируемые заболевания // М.-1996 г.
8. В.В. Покровский, Т.Н. Ермак, В.В. Беляева, О.Г.Юрин. ВИЧ–инфекция: клиника, диагностика и лечение //М. -2000 г.
9. А.А. Мельник. Референтные значения лабораторных показателей у детей и взрослых //Киев. -2000г.
10. В.С. Камышников. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике, том.1,2 // Минск. -2000 г.
11. В.И. Покровский, О.К.Поздив. Медицинская микробиология//М. -1999 г.
12. Ю.П. Финогеев, Ю.В.Лобзин, Ю.А.Винникмен, С.М.Захарченко, Ю.Н. Громько, А.Н.Усков. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней // Санкт- Петербург. –2001г.
13. А.В.Литвинов. Нормы в медицинской практике (справочное пособие) // Москва. -2002 г.
14. Ю.В. Хмелевский, О.К.Усатенко. Основные биохимические контакты человека в норме и при патологии // Киев. - 1987г.
15. Г.И.Назаренко, А.А.Кишкун. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований // Москва. - 2002 г.
16. Европейские стандарты диагностики и лечения заболеваний, передаваемых половым путем // Москва: Медицинская литература. -2003 г.
17. М.А. Базарнова. Руководство по клинической лабораторной диагностике, часть 1,2 // Киев. -1982 г.

18. А.М. Базарнова, В.Т. Морозова. Руководство по клинической лабораторной диагностике, ч. 3, Клиническая биохимия // Киев, -1990 г.

19. Н.М. Овчинников, В.Н.Беднова, В.В. Делекторский. Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем//Москва. -1987 г.

20. И.И. Мавров. Контактные инфекции, передающиеся половым путем// Киев. -1999 г.

21. Иммунологические методы. Перевод с немецкого А.П.Тарасова // Москва. -1987 г.

22. З.С. Баркогон. Геморагические заболевания и синдромы // Москва. -1988 г.

23. В.В. Меншиков. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник//Москва. -1987 г.

24. А.В. Шабров и соавт. Профилактика и лечение оппортунистических инфекций, кандидозов и гельминтозов. Книга 1// Санкт-Петербург-Москва, -2002 г.

25. Дифференциальная лабораторная иммунодиагностика вирусных гепатитов. Методические рекомендации. Министерство обороны Российской Федерации, Главное военно-медицинское управление // Москва. -2002 г.

26. В.М. Бондаренко, Н.М.Грачева, Т.В.Мацулевич. Дисбактериозы кишечника у взрослых // Москва. -2003 г.

27. Т.Я. Свищева. Атлас клеток крови и паразитов человека//Москва – Санкт-Петербург. -2002 г.

28. В.В. Меншиков. Клиническая лабораторная аналитика // Москва. -2002 г.

29. Увеличение масштабов применения антиретровирусной терапии в условиях ограниченных ресурсов: Руководство по применению методов общественного здравоохранения // ВОЗ, - апрель 2002 г.

30. John G.Bartlett, Joel E.Gallant. Medical Management of HIV-infection. – 2003. –р.430.

31. Clinical Management of the HIV-infected Adult. A manual for midlevel clinicians. Originally published September 1993, revised March 2003.

32. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4⁺ T-Cell Determinations with CD 45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. Recommendation and Reports: January 31, 2003

33. Пособие по разработке протоколов лечения ВИЧ-инфекции для Украины и других стран Содружества Независимых Государств, штаб-квартира ВОЗ, 5-6 мая 2003 г.8.

ДОДАТКИ

Таблиця 1

Графік та об'єм лабораторних досліджень ВІЛ-інфікованих, які знаходяться на диспансерному нагляді

| № п/п | Лабораторний тест | Тести, необхідні при в'їзті на диспансерний облік | Періодичність проведення тестів при диспансерному нагляді |
|-------|--|---|---|
| 1 | Загальний аналіз крові | + | 1 раз в 4 тижні |
| 2 | Біохімічний аналіз крові | + | 1 раз в 4 тижні |
| 3 | Загальний аналіз сечі | + | 1 раз в 4 тижні |
| 4 | Дослідження на сифіліс | + | 1 раз в 6 міс. |
| 5 | Визначення маркерів гепатиту В і С | + | 1 раз в 6 міс. |
| 6 | Дослідження на пневмоцистоз | + | 1 раз в 4 тижні |
| 7 | Дослідження на кандиди | + | 1 раз в 4 тижні |
| 8 | Тест на вагітність у жінок | + | при кожному звертанні |
| 9 | СД4 ⁺ та вірусне навантаження | + | залежно від стадії ВІЛ-інфекції |
| 10 | Вірусне навантаження | + | за клінічними показниками |

Таблиця 2

**Зміна лабораторних показників залежно від стадії
ВІЛ-інфекції (дорослі)**

| № п/п | Назва | Норма | I стадія | СНІД-асоційований комплекс |
|-------|----------------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | Гемоглобін | 130-164 г/л | зміни незначні | гемоглобінемія |
| 2 | Еритроцити | 3,7 - 4,7 г/л | зміни незначні | еритроцитопенія, анемія |
| 3 | Лейкоцити | 4,0-8,8 .10 ⁹ л | зміни незначні | лейкоцитопенія |
| 4 | Нейтрофіли | 50-72 % | зміни незначні | нейтропенія |
| 5 | Лімфоцити | 19-37 % | зміни незначні | лімфопенія |
| 6 | Моноцити | 3-11 % | без змін | без змін |
| 7 | Тромбоцити | 180- 320 . 10 ⁹ /л | зміни незначні | тромбоцитопенія без змін |
| 8 | ШОЕ | 1- 15мм/ч 1-25 мм/ч | зміни незначні | ШОЕ збільшене |
| 9 | АЛТ | 0,5- 0,7 мккат/л | без змін | без змін, зміни незначні |
| 10 | АСТ | 0,5 -0,75 мккат/л | без змін | збільшене |
| 11 | Білірубін | 8,5 -20,5ммоль/л | без змін | без змін або збільшені |
| 12 | Сечовина крові | 4,2 -8,3ммоль/л | без змін | без змін або збільшені |
| 13 | Креатинін | 50-115мкмоль/л | без змін | без змін або збільшені |
| 14 | Глюкоза крові | 3,1 - 6,4 ммоль/л | без змін | без змін або збільшені |
| 15 | ЛДГ | до 460 МО | без змін | збільшені |
| 16 | Загальний білок | | | |
| 17 | Альбумін | | | |
| 18 | Холестерин | | | |
| 19 | Тригліцериди | | | |
| 20 | СД 4 ⁺ | | | |
| 21 | Вірусне навантаження | | | |

Таблиця 3

**Графік диспансерного спостереження ВІЛ-інфікованого
пацієнта на початку та продовженні ВААРТ**

| Оцінка | тижня | | | Початок ВААРТ | | | | | | | | місяці | | | | | |
|--|-------|----|---|---------------|---|---|---|---|---|---|---|--------|---|----|----|----|--|
| | -4 | -2 | 0 | 2 | 4 | 8 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Дотримання режиму лікування | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • | |
| Загальний стан | • | | • | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| Супутні захворювання | • | | • | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| Повний анамнез дійсного захворювання | • | | • | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| Фізикальний огляд | • | | • | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| Визначення лабораторних показників: | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| • Гемоглобін | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| • Еритроцити | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| • Тромбоцити | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| • Загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарна формула | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| • Показники функції печінки (АЛТ, АСТ, білірубін) | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • | |
| • Креатиніни, сечовина крові | | • | | | | | • | | • | | | | • | | | • | |
| • ЛДГ крові | | • | | | | | • | | • | | | | • | | | • | |
| • α-амілаза крові | | • | | | | | • | | • | | | | • | | | • | |

Таблиця 3
(продовження)

| Оцінка | тижня | | | | | | місяці | | | | | | | | | |
|--|--|----|---|---|---|---|--------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | -4 | -2 | 0 | 2 | 4 | 8 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| • Глюкоза крові | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • |
| • Холестерин, тригліцериди крові | | • | | | | | • | | | • | | | • | | | • |
| • Загальний білок та альбумін крові | | • | | | | | • | | | • | | | • | | | • |
| • Загальний аналіз сечі | • | • | | • | • | • | • | • | • | • | | | • | | | • |
| • Кал на яйця глистів і найпростіші | | • | | | • | | • | | | • | | | • | | | • |
| Кількість CD4 ⁺ лімфоцитів | • | • | | | | | • | | | • | | | • | | | • |
| Гінекологічний огляд | • | | | | | | | | | • | | | | | | • |
| Рентгенографія грудної клітки | • | | | | | | | | | | | | | | | • |
| Туберкулінова проба | • | | | | | | | | | | | | • | | | |
| Тест на вагітність* | | • | | | | | | | | | | | | | | |
| Критерії початку АРТ | • | | • | | | | | | | | | | | | | |
| Інші діагностичні дослідження і консультації фахівців (окуліста, невропатолога, дерматолога, психіатра, оториноларинголога, фтизіатра) залежно від наявності конкретних скарг чи симптомів | При необхідності, за рішенням лікуючого лікаря | | | | | | | | | | | | | | | |

* Тест на вагітність оптимально проводити не пізніше, ніж за три доби до початку АРТ.

Хоч кількісні методи визначення ВІЛ у крові дозволяють найточніше оцінювати ефективність проведеного лікування і визначати момент, коли воно стає неефективним, їхнє систематичне застосування в хворих, що приймають антиретровірусні препарати, у початкову програму розширення масштабів застосування АРТ в Україні включено не було. Надалі, при впровадженні в Україні кількісних методик ВІЛ, ця ситуація зміниться.

Таблиця 4

Лабораторні дослідження при СНІД-асоційованих інфекціях

| № п/п | НОЗОФОРМИ | БІОЛОГІЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ | СПЕЦИФІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | КЛІНІЧНІ ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ |
|-------|--|---|--|--|
| 1 | Герпес, ЦМВ, гепатит А, В, С, Д, вірус Епштейн-Барр | кров, біоптати печінки, слизових лімфатичних вузлів, мозку, легень | мікроскопічне дослідження фарбованих препаратів, імуно-флюоресцентна мікроскопія, ІФА, ІgG, ІgM, ПЛР, морфологічне дослідження біоптатів, тканин | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, АСТ, глюкози, сечовини, креатиніни, лужня фосфатаза, холестерину, ЛДГ, ліпіди |
| 2 | Сальмонельоз, шигельоз, бактероїди, стафілококи, клостридії, стрептококи | кров, фекалії, жовч, сеча, виділення з рота, очей, вух, ран, статевих органів, біоптати тканин, лімфатичних вузлів | бактеріологічне дослідження ІФА, РНГА, ПЛР, імунофлюоресцентна мікроскопія, мікроскопія фарбованих мазків | загальний аналіз крові, сечі, білірубіну, АЛТ, АСТ, глюкози, сечовини |
| 3 | Нейсерії, стрептококи, пневмококи, паличка інфлюенція | мазки із зів, носа, кров, сеча, фекалії, спинно-мозкова рідина. | мікроскопічне дослідження фарбованих мазків, бактеріологічне дослідження, імунофлюоресцентна мікроскопія, ІФА, ПЛР | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, АСТ, глюкози |
| 4 | Туберкульоз мікобактеріози (атипові мікобактерії) | харкотиння, промивні води бронхів, спинно-мозкова рідина, сеча, фекалії, біоптати лімфовузлів, шкіри, слизових оболонок кишечника, кісток, мезентеріальних вузлів | мікроскопічне дослідження фарбованих мазків, бактеріологічне дослідження, ІФА, ПЛР | загальний аналіз крові, сечі, харкотиння, білірубіну, АЛТ, АСТ, глюкози, сечовини, креатиніну, ЛДГ |

Таблиця 4
(Продовження)

| № п/п | НОЗОФОРМИ | БІОЛОГІЧНИЙ МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ | СПЕЦИФІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | КЛІНІЧНІ ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ |
|-------|---|---|--|--|
| 5 | Пневмоцистоз | слиз з горла, харкотиння, промивні води бронхів, трахеї, аспірат з бронхів, біоптат тканини легень, кров | мікроскопічне дослідження фарбованих мазків, ІФА, ПЛР | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, АСТ, глюкоза крові |
| 6 | Токсоплазмоз | кров, люмбальний ліквор, біоптат-лімфовузлів | ІФА, ІgM, ІgG, ІgA, ПЛР, морфологічні дослідження біоптатів тканин | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, АСТ, сечовина, глюкоза крові |
| 7 | Криптоспоридіоз | фекалії, блювота, харкотиння, жовч, біоптати слизової кишки, промивні води бронхів (при підозрі на криптоспоридіоз органів дихання) | мікроскопічне дослідження фарбованих мазків | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, лужна фосфатаза, сечовина крові |
| 8 | Ізоспоридіоз | фекалії, блювота, харкотиння, жовч, біоптати слизової кишки, промивні води бронхів (при підозрі на ізоспоридіоз органів дихання) | мікроскопічне дослідження фарбованих мазків | загальний аналіз крові, сечі, АЛТ, лужна фосфатаза, сечовина крові |
| 9 | Кандидоз, гістоплазмоз, кокцидіоз, аспергільоз, актиномікоз | кров, сеча, харкотиння, фекалії, гній, виділення з очей, вух, рота, статевих органів, абсцесів, промивні води, ліквор, біоптати тканин, лімфовузлів | мікроскопічне дослідження нативних препаратів та фарбованих препаратів, бактеріологічне дослідження біологічних субстратів, ІФА, ПЛР, імунофлюоресцентна мікроскопія | загальний аналіз крові, сечі, АСТ, АЛТ, сечовина, глюкоза крові |

Таблиця 5

Лабораторна діагностика клінічних проявів СНІД-асоційованих інфекцій

| № | Віруси | Бактерії | | Найпростіші | | метод. діагностики | | Гриби | |
|---|---|----------------------------------|---|---|--|--------------------|---|--|--|
| | | назва | метод. діагностики | назва | метод. діагностики | назва | метод. діагностики | назва | метод. діагностики |
| 1 | Ураження легень | ЦМ Ввірус простого герпесу (ВПГ) | ІФА, ІgM, ПЛР, морфологічне дослідження біоптатів | Мікобактерії туберкульозу, стрептокок, пневмокок, гемофіли, стафілокок, ентеро-бактерії | Бактеріологічне дослідження ІФА, ПЛР, мікроскопія | Єсатії | Мікроскопія | Кандида, криптокок, Актиноміцети, аспергії | Бактеріологічне дослідження, мікроскопія, ІФА, ПЛР |
| 2 | Ураження ЦНС (менингіт, енцефаліт, локальні ураження) | ЦМВ, ВПГ, EBV | ІФА, ІgM, ІgG, ІgA, Мікроскопічне дослідження біоптатів | Менінгокок | Мікроскопія фарбованих препаратів, бактеріологічне дослідження | Токсоплазма | ІФА, ІgM, ІgG, ІgA, мікроскопічне дослідження біоптатів тканин, мозку | Криптокок, аспергії, кандида | Мікроскопія фарбованих препаратів, бак. дослідження ІФА, ПЛР, імунофлюоресцентна мікроскопія |

Таблиця 5
(продовження)

| № | Віруси | Бактерії | | Найпростіші | | метод. лаб. діагностики | | Гриби | |
|---|-------------------------------------|---|--|---|--|-----------------------------|---|---------------------------------|---|
| | | назва | метод. лаб. діагностики | назва | метод. лаб. діагностики | назва | метод. лаб. діагностики | назва | метод. лаб. діагностики |
| 3 | Ураження шлунка, кишечника, печінки | ЦМВВПГ, вірус гепатиту А, В, С, Д | ІФА, ІgM, ІgG, ПЛР, морфологічні дослідження біоптатів | Сальмонели, шигели, мікобактерії, умовно-патогенні ентеробактерії | Бакдослід., ІФА, ПЛР, РИГА | Криптоспоридії, ізоспоридії | Мікроскопія біосубстратів, імунофлюоресцентна мікроскопія | Кандида | Бактеріологічне дослідження, мікроскопія, ІФА, ПЛР |
| 4 | Ураження шкіри та слизових оболонок | ВПГ, герпес зостер, ЦМВ, папілома вірус | Мікроскопія елементів шкіри, ІФА, ІgM, ІgG, ПЛР | Стафілококи, стрептококи групи В | Мікроскопія фарбованих препаратів, бактеріологічне дослідження | Короста, лейшманії | Мікроскопія елементів шкіри | Кандида, аспергії, актиноміцети | Бактеріологічне дослідження, імунофлюоресцентна мікроскопія |

Таблиця 6

Мутації стійкості
(за матеріалами «Medical Management of HIV-infection» John G.Bartlett, Joel E.Gallant. – 2003)

| Препарат | Мутації | Коментарії |
|--|---|--|
| Нуклеозиди і нуклеотиди | | |
| AZT | 41, 67, 70, 210, 216, 219 | TAM – тимідин-аналогові мутації, викликає зниження чутливості до AZT, d4T, ABC, ddI, ddC, TDF, 3TC |
| 3TC | 184 (44, 118) | Стійкість до високих рівнів 3TC; підвищує активність d4T, AZT і TDF; знижує чутливість до ddI, ddC, ABC. |
| ddC | 65, 69, 74, 184 | |
| d4T** | 41, 67, 70, 75, 210, 215, 219 | Специфічна мутація в 75 кодоні переважно спостерігається in vitro. Стійкість in vitro залежить від числа TAM, які знижують чутливість до всіх НІЗТ. |
| ABC*** | 41, 65, 67, 70, 74, 115, 184, 210, 215, 219 | Стійкість залежить від кількості TAM ± M184V. Наявність M184V в поєднанні з ≥ 3-4 TAM, пов'язано з стійкістю до абакавіру. Деякі з цих мутацій призводять до перехресної резистентності до 3TC, ddI і TDF. |
| TDF | 65, 69 інсерція, ≥ 3 TAM, у тому числі 41L або 210W | Знижена активність при K65R і виникає стійкість при інсерції 69. |
| Мультинуклеозидна стійкість – A Q151M комплекс | 151, 62, 75, 77, 116 | Стійкість до всіх НІЗТ, але не до тенофовіру. Може виникати як в поєднанні з TAM, так і незалежно. |
| Мультинуклеозидна стійкість – B T69 інсерція | 69 (інсерція), 41, 62, 67, 70, 210, 215, 219 | Виникає в поєднанні з TAM. Дає стійкість до всіх НІЗТ і TDF, але не до DAPD. |
| Мультинуклеозидна стійкість – множинні TAM | 41, 67, 70, 210, 215, 219 | Надає стійкість до всіх НІЗТ, включно TDF |
| ННІЗТ | | |
| NVP | 100, 103, 106, 108, 181, 188/C/L/H, 190 | Y181C – переважна мутація при лікуванні невірапіном, якщо він застосовується не в поєднанні з AZT; у разі одночасного прийому цих двох препаратів переважно виникає мутація – K103N. |

Таблиця 6
(Продовження)

| Препарат | Мутації | Коментарії |
|------------------------------------|------------------------------------|---|
| DLV | 103, 181, 236, 318 | |
| EFV | 100, 103, 108, 181, 188L, 190, 225 | Мутація 181С сприяє виникненню перехресної стійкості. Стійкість виникає при 188L. |
| Мульти-ННІЗТ-стійкість | 103, 188L | Наявність цих мутацій значно знижує активність до всіх ННІЗТ. |
| Накопичення мульти-ННІЗТ-стійкості | 100, 106, 181, 190, 230 | ≥ 2 з цих мутацій значно знижує активність всіх ННІЗТ. |

Таблиця 6
(Продовження)

| Препарат | Крупні мутації | Дрібні мутації | Коментарії |
|---------------------------------|----------------|---|---|
| Інгібітори протеази (ІП) | | | |
| IDV | 46, 82, 84 | 10, 20, 24, 32, 36, 54, 71, 73, 77, 90 | Для розвитку стійкості потрібно не менше 3 мутацій, активність знижується у 4 рази. |
| NFV | 30, 90 | 10, 36, 46, 71, 77, 82, 84, 88 | D30N – найбільш розповсюджена мутація, не виникає перехресної стійкості до ІП. Іноді виникає L90M, призводячи до більшої перехресної стійкості. |
| RTV | 82, 84 | 10, 20, 32, 33, 36, 46, 54, 71, 77, 90 | Виникає перехресна стійкість з індинавіром. |
| SQV | 48, 90 | 10, 54, 71, 73, 77, 82, 84 | Мутація кодону 48 унікальна, але L90M сприяє перехресній стійкості. |
| APV | 50V, 84 | 10, 32, 46, 47, 54, 73, 90 | I50V пов'язана з перехресною стійкістю до лопінавіру. |
| LPV/г | 73 | 10, 20, 24, 32, 33, 46, 47, 50V, 53, 54, 63, 71, 73, 82, 84, 90 | ≥ 6 мутацій призводять до зниженої реактивності. I50V знижує чутливість до лопінавіру. |
| Атазанавір | 50L | 32, 46, 54, 71, 82, 84, 88, 90 | 50L і 71 виникають у випадку, якщо це перший ІП, який приймає пацієнт. У пацієнтів, які раніше приймали ІП, – виникають 54 і 84. |

Таблиця 6
(Продовження)

| Препарат | Крупні мутації | Дрібні мутації | Коментарії |
|-------------------------|----------------|----------------|---|
| Мульти-ІП-стійкість | 46, 82, 84, 90 | 10, 54 | ≥ 4 або 5 мутацій призводять до стійкості до багатьох ІП одночасно. |
| Інгібітори входу | | | |
| T20 | | | Стійкість виникає в капсульному гені (позиції 36-45). |

** **Крупні мутації** – розвиваються першими, пов'язані зі зниженням ефективності препаратів і підвищенням вірусної активності, впливають на фенотипову стійкість.
*** **Дрібні мутації** – з'являються пізніше і значно не впливають на фенотипову стійкість.

Таблиця 7

Вимоги до відбору матеріалу для проведення досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції

| Об'єкт дослідження | Вимоги до забору матеріалу, умови зберігання і транспортування |
|--------------------|---|
| Кров | Збір крові проводиться натще з ліктьової вени в спеціальну вакуумну систему типу Vacutainer, Monovet і т.ін. Як антикоагулянт використовується цитрат Na або КЗЕДТА. Забороняється використовувати гепарин. Максимальний термін зберігання до відправлення в лабораторію – 4 години при 4°C. При неможливості доставити матеріал в цей термін, кров центрифугують, плазму відбирають у стерильні пробірки типу «Епендорф» стерильними одноразовими наконечниками з фільтрами. Для тривалого зберігання плазму заморожують при -20° С. Наступне транспортування здійснюють на холоді. |
| Ліквор | Збір матеріалу проводиться одноразовим шприцом у кількості 1 мл. Відібраний матеріал кладуть у стерильну пробірку типу «Епендорф». Термін зберігання 4 години при температурі +4-+8°C до відправлення в лабораторію. Транспортування здійснюють в спеціальних контейнерах на холоді. |
| Слина | За 2 години перед забором слини слід припинити приймання їжі та тричі прополоскати рот фізіологічним розчином. Відбір слини проводиться в стерильну одноразову пробірку в кількості 3-5 мл. Матеріал необхідно відібрати безпосередньо перед дослідженням або негайно доставляти в лабораторію. При неможливості доставки слину після взяття слід негайно заморозити . Транспортування здійснюється в замороженому стані (спеціальний контейнер зі льодом). |

Таблиця 7
(продовження)

| Об'єкт дослідження | Вимоги до забору матеріалу, умови зберігання і транспортування |
|---------------------------------|---|
| Мазок з ротоглотки | Відбір матеріалу проводиться робочою частиною одноразового аплікатора з задньої стінки глотки і крипт мигдалин. Аплікатор кладуть в стерильну одноразову пробірку з транспортним середовищем. Термін зберігання 4 години при +4-8° С до відправки в лабораторію. Транспортують в замороженому стані (спеціальний контейнер з льодом). |
| Мазки з кон'юнктиви ока | При наявності гною його забирають стерильним ватним тампоном, змоченим фізіологічним розчином. Мазок беруть з внутрішньої поверхні нижньої повіки рухом від зовнішнього кута до внутрішнього кута ока. Робочу частину зонду з матеріалом для дослідження відрізають і кладуть в стерильну одноразову пробірку з транспортним середовищем. Матеріал зберігають при температурі +4-8°С 4 години до відправки в лабораторію. Транспортування здійснюють в спеціальних контейнерах на холоді. |
| Сеча | Для аналізу відбирається перша порція ранкової сечі в кількості 10 мл. в спеціальний флакон або пробірку без консервуючого розчину. Максимальний термін зберігання 1 доба при +4°С . |
| Біопсійний матеріал | Біопсійний матеріал кладуть в стерильну пробірку типу «Епендорф», яка містить 0,5-1 мл. фізіологічного розчину. Матеріал зберігають при температурі +4-8° С 4 години до відправлення в лабораторію. Транспортування здійснюють в спеціальних контейнерах на холоді. |
| Матеріал з уретри | У жінок зонд вводиться в уретру на глибину 1,0-1,5 см, у чоловіків - на 3-4 см, потім робиться декілька обертаельних рухів (у дітей матеріал для дослідження береться з зовнішнього отвору уретри). Робочу частину зонду з матеріалом для дослідження відрізають і кладуть в стерильну одноразову пробірку, що містить транспортне середовище або фізіологічний розчин. Матеріал зберігають при температурі +2°-+8° С протягом 4 годин до відправлення у лабораторію. Транспортування здійснюють в спеціальних контейнерах на холоді. |
| Матеріал з цервікального каналу | Перед забором матеріалу ватним тампоном необхідно віддалити слиз і обробити шийку матки стерильним фізіологічним розчином. Зонд вводять в цервікальний канал на глибину 0,5-1,5 см. При наявності ерозій цервікального каналу їх необхідно обробити стерильним фізіологічним розчином, матеріал належить брати на межі здорової і зміненої ткани. При вилученні зонду слід уникати його торкання до стінок влагалища. Робочу частину зонду з матеріалом для дослідження відрізають і кладуть в стерильну одноразову пробірку, що містить транспортне середовище або фізіологічний розчин. Матеріал зберігають при температурі +2°-8° С протягом 4 годин до відправлення у лабораторію. Транспортування здійснюють в спеціальних контейнерах на холоді. |