

Н.А. Ничик

СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ГРВІ

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

Наведено сучасні наукові дані про специфічні методи діагностики ГРВІ та грипу. Отримані результати обстеження хворих з ГРВІ вказують на різноманітність етіологічної структури в епідемічний період.

Ключові слова: ГРВІ, грип, віруси, специфічна діагностика, серологічні дослідження.

В розвинутих країнах гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) – найрозповсюдженіші інфекційні хвороби [1]. Значна поширеність зумовлена невпинною мінливістю збудників, надзвичайною активністю механізму їх передачі та розвитком нестійкого імунітету після перенесеної хвороби [2-4]. В Україні на ГРВІ щороку хворіє від 9 до 16 мільйонів осіб і половина випадків з них припадає на короткий період епідемії (4-8 тижнів), тому своєчасна специфічна діагностика вкрай важлива. Швидко встановлений діагноз дозволяє своєчасно вжити необхідні протиепідемічні заходи та призначити противірусні засоби, ефективність яких суттєво залежить від часу застосування.

Етіологічна діагностика ГРВІ можлива при використанні сучасних специфічних лабораторних методів. У міжепідемічний період діагноз грипу обов'язково повинен бути підтверджений лабораторно (специфічними діагностичними тестами) [5-8].

Діагноз може бути розшифрований виявленням або самого збудника (культури, окремих антигенів чи генетичного матеріалу), або специфічної відповіді організму на нього (антитіла, реакції клітинного імунітету). Забір біоматеріалу повинен проводитися в ранні терміни хвороби, з належною обережністю, оскільки працівник може інфікуватися секретами з дихальних шляхів пацієнтів.

Для виявлення збудника використовують такі специфічні методи досліджень.

Найбільш точним методом діагностики є *вірусологічний* – виділення вірусу грипу із секретів верхніх дихальних шляхів або з крові, за необхідності – патогістологічного матеріалу бронхів і легеневої тканини. Рекомендується брати матеріал у пацієнта з різних місць, що полегшує виявлення вірусу. Обов'язкові умови проведення дослідження – забір матеріалу від хворого в ранній термін хвороби (1-2-у добу або пізніше, за на-

явності катаральних явищ), транспортування в охолодженому стані (у термосі, заповненому льодом, або портативному холодильнику) у вірусологічну лабораторію. Для виділення вірусу грипу найчастіше використовують курячі ембріони, рідше – культуру клітин і лабораторних тварин. Індикацію виділеного вірусу проводять за допомогою реакції нейтралізації з типовими сироватками (РН) й реакції гальмування гемаглютинації (РГГА). Метод дозволяє вивчати біологічні властивості вірусів, особливо при появі нових епідемічних збудників, розробляти рекомендації стосовно лікування і хіміопрофілактики захворювання, а також визначати склад протигрипозної вакцини на наступний епідемічний період. Недолік – вірусологічний метод є найскладнішим у проведенні і найдорожчим, займає багато часу (дні-тижні), тому у практичній медицині застосовується рідко [9].

Для виявлення антигенів використовують імунофлюоресцентний метод, в якому діагностиком є флуоресціюючі поліклональні антитіла (Ф-ПКА), мічені флуорохромом. В результаті утворюються специфічні комплекси антиген-антитіло, що проявляється яскравим світінням у полі зору люмінесцентного мікроскопа [10, 11]. Доведена висока чутливість (80,0–82,1%) і специфічність (87,5–90,9%) методу. Результат аналізу може бути отриманий уже через 3-5 годин після доставки матеріалу в лабораторію.

Реакція імунохроматографії (ІХА) (експрес-метод діагностики ГРВІ) характеризується швидким отриманням результатів (через 15-30 хв після постановки реакції, яка може проводитися безпосередньо біля ліжка хворого, не потрібен лабораторний персонал та спеціальне оснащення —Cito-test). Метод ІХА дозволяє швидко встановити тип і навіть підтип вірусу, яким уражений хворий, а також відібрати пацієнтів для подальшого поглибленого серологічного та вірусологічного обстеження. Слід зауважити, що метод високоефективний і специфічний, однак дієвий лише у перші 2 доби хвороби. Окремі повідомлення про недостатню ефективність ІХА-методу швидше за все пов'язані з неправильним проведенням або іншими причинами [12].

Важливим методом остаточної *діагностики* грипу є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який проводиться для ідентифікації вірусного геному із визна-

ченням типу та підтипу вірусу грипу в клінічних зразках або культурі вірусу, вирощеної на курячому ембріоні. За допомогою ПЛР можна якісно та кількісно визначати РНК вірусів грипу А і В, парагрипу (типи 1, 2, 3), респіраторно-синцитіального вірусу типів А і В у зразках, узятих з носа [13]. Метод чутливий, специфічний, дозволяє одержати результат уже через 24 год і в ранні строки почати специфічну терапію. Недоліки – зниження достовірності результатів з 6-го дня хвороби і пізніше до 50,0 % [14], можливість отримання «хибнопозитивних» даних (необхідність дотримання суворих правил обладнання лабораторій – обов'язково має бути фільтр з біологічним рівнем очищення 99,9 %).

Антигени збудника також можна визначити за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), використовуючи в якості діагностикума моноклональні антитіла. Метод ІФА має високу чутливість і специфічність, яка сягає 90%. Матеріалом для дослідження є сироватка крові, взята натщесерце.

Метод молекулярної гібридизації дозволяє виявити ген збудника серед десятків тисяч інших в організмі людини. Різні модифікації цього методу дозволяють аналізувати вкрай малі кількості ДНК у матеріалі, взятому від хворого. Однак, поки що, такі дослідження не знайшли широкого практичного застосування, оскільки для успішного використання їх у практичній медицині потрібне створення бібліотек радіоактивних зондів усіх послідовностей ДНК геному людини [15].

Для ретроспективної діагностики найчастіше використовують метод дослідження парних сироваток (узятих у розпал захворювання і через 7-14 днів), в якому наростання титру антитіл в 4 і більше разів є підтвердженням встановленого діагнозу. Серологічна діагностика грипу забезпечує точне визначення етіології хвороби шляхом виявлення в крові динаміки збільшення (рідше зниження) кількості специфічних антитіл під час захворювання. Відсутність такої динаміки (навіть за наявності високого титру антитіл) не дозволяє стверджувати про наявність хвороби на час обстеження, швидше це свідчить про перенесену інфекцію у минулому [14]. Така серологічна діагностика незамінна при атиповому або безсимптомному перебігу респіраторної інфекції [10]. У практичній охороні здоров'я найчастіше користуються РГГА, реакцією непрямой гемаглютинації, іноді реакцією зв'язування комплекменту (коефіцієнт чутливості яких складає відповідно близько 70-80 %), рідко – РН чи радіального гемолізу (результати можна отримати вже через кілька годин). Серед інших методів, рекомендованих для ретроспективної діагностики, можна відзначити метод диференційованого визначення антитіл за допомогою речовин, що редукують, реакцію

визначення антитіл до нейрамінідази та інші (імунодифузні, імуноензимні і радіоімунні методи) [9]. Основна перевага цих методів – можливість оцінити динаміку процесу, про яку свідчить рівень антитіл. Недолік – непрямий метод діагностики (дозволяє визначити імунну відповідь організму на збудника, а не самого збудника), а також висока вартість і відсутність вибору експрес-тестів [16]. Останнім часом стає доступним визначення специфічних антитіл не тільки до вірусів грипу, але й до інших респіраторних вірусів (парагрипу, аде-новірусу, респіраторно-синцитіального) [17].

Під час епідемічного сезону 2009-2010 рр. у Тернопільській області було обстежено 55 стаціонарних хворих на грип та інші ГРВІ методом ПЛР [18]. Позитивні результати отримано у 42 (76,4 %) осіб, у тому числі у 26 (61,9 %) – виявлено різні комбінації по 2-8 збудників одночасно в одного і того ж пацієнта. Спектр збудників був представлений: RS-вірус – у 15 (35,7 %), метапневмовірус – у 13 (30,9 %), парагрип-1 – у 21 (50,0 %), парагрип-2 – у 2 (4,8 %), парагрип-3 – у 19 (45,2 %), парагрип-4 – у 13 (30,9 %), коронавірус – у 19 (45,2 %), риновірус – у 5 (11,9 %), вірус грипу А – у 4 (9,5 %), А/Н1N1sw – у 7 (16,7 %), грипу В – у 12 (28,6 %). Аде-новірус не знайдено у жодного хворого. Вірус парагрипу загалом виявлено у 39 (70,9 %) обстежених, у кожного третього в комбінації парагрип-3 + парагрип-4. Вірус грипу А («сезонного») в усіх випадках поєднувався з вірусом А/Н1N1sw, різними типами вірусів парагрипу і коронавірусами, а також у трьох випадках із чотирьох – з метапневмо- і RS-вірусом. Вірус грипу В тільки у 2 (16,7 %) пацієнтів був як моноінфекція, у решти – в комбінації з різними типами парагрипу (83,3 %), а також в 1 хворого визначено одночасно віруси грипу В+А+А/Н1N1sw. За даними МФА, отриманими при одночасному обстеженні тих самих хворих, позитивні результати були лише у 16 (29,1 %) осіб, при цьому аде-новірус – у 2 (3,6 %), віруси парагрипу – у 3 (5,5 %), грипу А – у 4 (7,3 %), А/Н1N1sw – у 3 (5,5 %), грипу В – у 4 (7,3 %) [14]. Отримані результати чітко вказують на необхідність специфічної діагностики ГРВІ як в епідемічний, так і в міжепідемічний періоди, оскільки в більшості випадків на підставі лише клінічних симптомів неможливо віддиференціювати ГРВІ між собою, а відповідно і спрогнозувати перебіг захворювання та призначити повноцінне лікування.

Таким чином, комплексне використання методів лабораторної діагностики грипу та ГРВІ може забезпечити найбільш достовірне відображення епідеміологічної та вірусологічної ситуації (щорічне сезонне підвищення захворюваності на грип та ГРВІ, поява нового виду збудника).

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Література

1. Зайко С.Д. Актуальные вопросы диагностики острых респираторных вирусных инфекций / Зайко С.Д. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 3. – С. 46-47.
2. Аминокислотные замены в гемагглютинине вируса гриппа подтипа Н5, влияющие на антигенную специфичность и вирулентность вируса / [П.С. Крылов, И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева и др.] // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 5. – С. 14-19.
3. Дифференцированное включение геномных сегментов в состав реассортантов вируса гриппа А при смешанной инфекции / [Н.Л. Варич, А.К. Гительман, А.А. Шилов и др.] // Вопросы вирусологии. – 2009. – № 1. – С. 7-12.
4. Механізми адаптації вірусів грипу А/FM/1/47 (H1N1) та A/Port Chalmers/1/73 (H3N2) до нового хазяїна / [Л.Д. Жаркова, С.Л. Рибалко, Г.П. Панасенко та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2009. – № 3. – С. 26-30.
5. Шляхи оптимізації лабораторних досліджень щодо грипу в пандемічний період / [Д.І. Переяслов, А.П. Міроненко, О.В. Цвіткова та ін.] // Сучасні інфекції. – 2010. – № 1. – С. 123-126.
6. Analytical detection of influenza A(H3N2)v and other A variant viruses from the USA by rapid influenza diagnostic tests / A. Balish, R. Garten, A. Klimov, J. Villanueva // Influenza Other Respi Viruses. – 2012, Sep 18. – doi: 10.1111/irv.12017.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). – Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for influenza A (H3N2)v virus and updated case count – United States, 2012
8. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis / [C. Chartrand, M.M. Leeflang, J. Minion et al.] // Ann. Intern. Med. 2012. – V. 156, N 7. – P. 500-511.
9. Гострі респіраторні вірусні інфекції / [Андрейчин М.А., Малий В.П., Ковальчук Л.Я. та ін.]. – Тернопіль: ТДМУ, 2011. – 304 с.
10. Рекомендации ВОЗ по лабораторной диагностике нового вируса гриппа А (H1N1) у людей – http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521_ru.pdf
11. Суховецкая В.Ф. Лабораторная диагностика острых респираторных вирусных инфекций в условиях эволюционной изменчивости вирусов гриппа / Суховецкая В.Ф. // Журнал инфектологии. – 2012. – № 1. – С. 36-41.
12. Печінка А.М. Гострі респіраторні захворювання: питання клінічної діагностики та лікування (лекція) / А.М. Печінка, М.І. Дземан // Укр. мед. часопис. – 2010. – Т. 79, № 5. – С. 94-103.
13. Yang S., Rothman R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings / S. Yang, R.E. Rothman // Lancet Infect. Dis. – 2004. – N 4. – P. 337-348.
14. Васильєва Н.А. Аналіз інформативності лабораторної діагностики грипу та інших ГРВІ / Н.А. Васильєва, Л.Я. Демет'єва, Я.І. Йосик // Інфекційні хвороби. – 2011. – № 4. – С. 14-16.
15. Молекулярно-генетические методы. – <http://www.medlix.ru/Book/book48.php>
16. Острые респираторные вирусные инфекции: современная диагностика, подходы к выбору терапии / Т.А. Перцева, Т.В. Киреева, А.В. Черкасова, Е.В. Братусь – <http://www.umj.com.ua/article/42180/ostrye-respiratornye-virusnye-infekcii-sovremennaya-diagnostika-podkhody-k-vyboru-terapii>
17. Йосик Я.І. Дослідження гуморального імунітету при парагрипі, аденовірусній та респіраторно-синцитіальній інфекціях / Я.І. Йосик // Інфекційні хвороби. – 2012. – № 2. – С. 35-38.
18. Порівняльний аналіз етіологічної структури ГРВІ за даними МФА, ПЛР, РГГА / [М.А. Андрейчин, Н.А. Васильєва, В.С. Копча та ін.] // Теоретичні засади оптимізації системи епідеміологічного нагляду за інфекційними хворобами в Україні та світі на сучасному етапі: читання, присвячені пам'яті акад. Л.В. Громашевського (13-14 жовтня 2011 р.). – Київ, 2011. – С. 10-12.

MODERN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS OF ACUTE RESPIRATORY VIRAL INFECTIONS

N.A. Nychyk

SUMMARY. The current scientific data on specific methods of acute respiratory viral infections and influenza diagnosing are shown. The results of examination of patients with acute respiratory viral infections indicate a variety of etiological structure in the epidemic period.

Key words: acute respiratory viral infections, influenza, viruses, specific diagnosis, serological studies.

Отримано 18.06.2013 р.