

# Современные возможности диагностики острых респираторных вирусных инфекций

Е.Н.Кожевникова, Г.А.Шипулин, А.В.Горелов

Центральный НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Применяемые до сих пор различные методы диагностики ОРВИ имеют ряд недостатков: вирусологический – длительный и дорогостоящий, требующий жестких условий забора материала и его транспортировки, иммунофлюоресцентный – субъективный, требует хороших навыков персонала, часто дает ложноположительные результаты по сравнению с культуральными методиками, иммуноферментный (на обнаружение антигенов) – нестабильный, дает большой разброс показателей специфичности и чувствительности метода, иммуноферментный (на обнаружение антител) и другие серологические методы применяются только для ретроспективной диагностики и определения напряженности иммунитета. Благодаря развитию методов генодиагностики (ПЦР) значительно расширились возможности и сократились сроки диагностики ОРВИ.

*Ключевые слова:* ОРВИ, лабораторная диагностика, ПЦР

## Modern possibilities of diagnostics of acute respiratory viral infections

E.N.Kozhevnikova, G.A.Shipulin, A.V.Gorelov

Central Research Institute of Epidemiology, Ministry of Public Health and Social Development of the Russian Federation

Various current methods of diagnosing ARVI have a number of disadvantages: the virologic method is extended and costly, putting rigid limitations on sampling and transportation of materials; the fluorescence immunoassay is subjective, requiring skilled personnel, often yields false-positive results as compared with cultural methods; the enzyme-linked immunoassay (antigen-detecting) is unstable, gives a considerable scatter of the indices of specificity and sensitivity of the method; the enzyme-linked immunoassay (antibody-detecting) and other serological methods are applicable only in retrospective diagnosing and determination of the immunity stress. The development of genodiagnostic methods (PCR) considerably enhances the possibilities and decreases the time for diagnosing ARVI.

*Key words:* ARVI, laboratory diagnostics, PCR

**В**ирусные инфекции в настоящее время доминируют среди всех инфекционных заболеваний, причем 90% всех случаев заболеваний приходится на долю гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [1]. В свете последних событий, когда вспышки возникающих респираторных инфекций, в силу современных возможностей транспорта, могут распространяться за очень короткое время с одного континента на другой, вопросы профилактики и диагностики ОРВИ получили новый толчок к развитию. Так называемая атипичная пневмония, или SARS, которая получила в России название ТОРС (тяжелый острый респираторный синдром), привлекла внимание ученых всего мира, и на ее примере мы наглядно увидели все существующие в наше время возможности и недостатки диагностики ОРЗ.

### Возможности клинической диагностики

Этиология ОРЗ крайне разнообразна. Возбудителями могут быть респираторные вирусы (РС-, адено-, рино-, грипп,

#### Для корреспонденции:

Кожевникова Елена Николаевна, аспирант детского клинического отделения Центрального НИИ эпидемиологии Министерства здравоохранения и социального развития РФ

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

Телефон: (095) 182-0992

Статья поступила 03.11.2004 г., принята к печати 09.02.2005 г.

парагрипп, метапневмо-), энтеровирусы, коронавирусы, реовирусы, герпесвирусы, многочисленные бактерии, грибы и атипичные микроорганизмы – хламидии, микоплазмы, пневмоцисты. В нашей стране на практике применяются специальные диагностические таблицы, которые содержат набор наиболее часто встречающихся при каждой вирусной инфекции клинических синдромов. В то же время хорошо известно, что клиническая картина многих ОРВИ во многом сходна, малоспецифична, а это делает диагностику данных заболеваний по совокупности клинических симптомов крайне затруднительной [2]. Использование таких таблиц, с одной стороны, помогает в постановке предварительного диагноза, а с другой – делает его условным. В настоящее время во многих странах мира придерживаются принципов доказательной медицины, предусматривающих обязательное подтверждение диагноза лабораторными исследованиями. Несоблюдение этого правила может приводить к постановке ложных диагнозов, например, в литературе описаны случаи, когда у больных с типичной клинической картиной гриппа при обследовании преимущественно выявлялся РС-вирус [3, 4].

### Методы лабораторной диагностики

Современные методы специфического лабораторного обследования больных для выявления этиологии ОРЗ включа-

ют изоляцию возбудителя, индикацию его антигенов или нуклеиновых кислот в материалах от больных и выявление нарастания титра специфических антител в динамике заболевания [5].

Для выделения и идентификации вирусных возбудителей клиническим материалом от больного заражают перевиваемые культуры клеток, куриные эмбрионы и лабораторных животных. Частота выделения вирусов в этом случае зависит от сроков взятия материалов от больных, условий хранения, доставки и первичной обработки. Решающее значение имеют ассортимент и качество клеточных культур и куриных эмбрионов, на которых проводят изоляцию вирусов. Материалом для выделения вирусов служат отделяемое носа, зева, конъюнктивы, а также секционный материал (ткани легкого, кусочки бронхов и др.). Такой метод весьма трудоемкий, длительный, поэтому в повседневной практике он почти не применяется. К недостаткам метода можно отнести также невозможность постановки диагноза микстинфекций.

Методы быстрой диагностики основаны на обнаружении вирусных антигенов в материалах, полученных от больных, с помощью специфических антител, маркированных флуорохромами или ферментами. Методы ранней лабораторной диагностики используют как для клинической лабораторной диагностики (для постановки диагноза пациенту), так и для быстрой расшифровки природы вспышек. В последние 20–30 лет в практике здравоохранения широкое распространение получил метод иммунофлюоресцентной диагностики (МИФ) гриппа и других ОРЗ. Наряду с ним внедряется и новый метод ранней диагностики гриппа, основанный на применении иммуноферментного анализа (ИФА).

Метод иммунофлюоресценции позволяет обнаружить вирусные антигены по их характерной локации непосредственно в клетках цилиндрического эпителия за счет взаимодействия антигенов со специфическими противовирусными антителами, мечеными флуоресцеинизотиоцианатом (прямой метод (ПИФ)). При непрямой ИФ (НИФ) препарат вначале обрабатывают немеченым противовирусным иммуноглобулином, а затем флуоресцирующими антителами против этого глобулина для выявления комплекса «вирус-иммуноглобулин». Преимуществом метода является возможность быстрого анализа небольшого числа проб (за 2–3 ч). Однако для правильной интерпретации результатов необходим определенный опыт работы. Тщательная микроскопия мазков требует значительного внимания и времени, что ограничивает возможности исследования и приносит в заключительный диагноз элементы субъективизма. Кроме того, методика наиболее эффективна в острой фазе заболевания и зависит в большей степени от качества забора клинического материала [6].

Имуноферментный метод индикации вирусных антигенов (ИФА) берут на вооружение для ранней дифференциальной диагностики ОРВИ и расшифровки природы вспышек.

Материалом для данного метода служат носоглоточные секреты (аспираты, смывы), полученные от больных. Преимуществом ИФА перед МИФ являются его высокая чувствительность и специфичность (93–97; 90–97%), возможность одновременного анализа большого числа клинических образцов, объективный количественный учет результатов [7].

Серологические методы диагностики ОРЗ, такие как реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и связывания ком-

племента (РСК), а также нейтрализации (РН), ИФА используются для определения уровня специфических антител в сыворотках больных ОРЗ с целью ретроспективного подтверждения диагноза. Эти методы также применяются для определения уровня коллективного гуморального иммунитета, ретроспективного анализа природы эпидемических вспышек, оценки иммуногенной активности гриппозных вакцин.

Существенным недостатком серологической диагностики является ее ретроспективный характер. Отчасти решить данную проблему можно при раздельном обнаружении антител методом ИФА, при котором обнаружение антител класса IgM всегда указывает на активно текущий инфекционный процесс, тогда как выявление антител класса IgG свидетельствует о перенесенном заболевании. Тем не менее, образование IgM часто «запаздывает» при ОРВИ, и только их нарастание в четыре раза в динамике заболевания (не менее 2 нед) может с большой долей вероятности говорить об остром течении инфекции.

В последнее время перспективы совершенствования диагностики ОРВИ связывают с использованием методов генодиагностики, а именно полимеразной цепной реакции (ПЦР). Она позволяет определить специфические участки нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в образце биологического материала. Метод обладает высокими показателями чувствительности и специфичности по сравнению с другими методиками [8, 9]. Так, в табл. 1, приведены данные R.Atmar et al., 1996 г. [10].

Таким образом, методика позволяет быстро (за 4–12 ч), с первых дней болезни, получить исчерпывающую информацию о возбудителе, прогнозировать характер течения и исход заболевания. К преимуществам метода следует отнести возможность выявления нескольких возбудителей одновременно в одной реакции в формате multiplex и возможность детекции специфических продуктов реакции в режиме реального времени («Real time» ПЦР) [11, 12].

### Сравнительные характеристики существующих методов диагностики ОРВИ

Учитывая большое разнообразие описанных выше методов, а также выпущенных на их основе коммерческих тест-систем, естественно, возникает вопрос: чему же отдать предпочтение? Поэтому мы задались целью проследить по литературным данным сопоставимость результатов проводимых исследований с использованием различных тест-систем для того, чтобы выбрать наиболее оптимальные из них.

Первым этапом планирования любого исследования становится выбор референтного метода диагностики (желательно, «золотого стандарта» в отношении предполагаемого инфекционного агента). Для респираторных вирусных инфекций таковым является изоляция самого вируса (K.Carroll, 2002). При этом многие авторы ссылаются на та-

Таблица 1. Сравнение различных диагностических тестов с изоляцией вирусов гриппа А

Метод	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Baxter Bartels Microscan IF (НИФ)	40	88
Imagen DF (DAKO) (ПИФ)	65	92
Becton Dickinson ELISA (ИФА на АГ)	75	100
RT-PCR (ПЦР)	95	98

что дата забора материала, условия его доставки и количество самого вируса в анализируемом материале играют огромную роль в получении конечного результата, так как невозможно стандартизировать данный этап. Кроме того, сроки получения результата велики. С целью повышения эффективности и ускорения процесса диагностики в исследованиях часто применяют его сочетание с МИФ, при этом возможны три варианта:

- первый, вирусологический → МИФ;
- второй, МИФ → вирусологический;
- третий, вирусологический и МИФ (параллельно).

Подобное сочетание методик исключает возможные ложноположительные результаты МИФ и ложноотрицательные результаты вирусологического метода, что очень важно в том случае, если в исследовании сравниваемый метод заведомо имеет высокие аналитические характеристики [13, 14].

Выбор клеточных культур для этого метода зависит от предполагаемой природы инфекционного агента. Часто описывают применение модификации культурального метода Shell vial (SV), которая значительно ускоряет время получения результата (16–40 ч) по сравнению с обычными методиками (4–5 дней и более) [15] и не уступает им по чувствительности и специфичности (табл. 2) [16].

Высокие показатели чувствительности и специфичности позволяют некоторым авторам считать ПЦР методом «золотого стандарта» для диагностики некоторых респираторно-вирусных инфекций [17, 25]. Коммерческие тест-системы на основе этого метода, тем не менее, только начинают появляться на мировом рынке. И хотя стоимость ПЦР-наборов на сегодняшний день велика, интерес к ним со стороны ученых огромен, поскольку с их применением открываются новые перспективы в исследовании респираторных инфекций.

Для быстрой диагностики ОРВИ применяют следующие коммерческие тест-системы на основе метода иммунофлюоресценции: DAKO Imagen (ПИФ, НИФ), Bartels Viral Respiratory Screening (НИФ), SimulFluor (Chemicon) (НИФ) и др. В литературе широко обсуждаются вопросы, связанные с областью применения данных тест-систем, так как их чувствительность и специфичность, заявленные фирмами-производителями, на практике оказываются гораздо ниже. Большое значение для этих тест-систем имеет качество антител, которыми обрабатывают клетки. При использовании моноклональных антител результаты обычно хорошо коррелируют с другими методами, что, например, заявлено в аннотации к тест-системе НИФ производства DAKO для диагностики ОРВИ (табл. 3).

В литературе можно встретить несколько другие данные. Так, в отношении Bartels Viral Respiratory Screening (НИФ) описаны чувствительность 69% и специфичность 97% по сравнению с культуральными методами, а по сравнению с SV – 85,9 и 87,1% [18]. В нашей стране широко применяются тест-системы для ПИФ производства НИИ гриппа РАМН (г. Санкт-Петербург) с использованием поликлональных ан-

Таблица 3. Сравнение характеристик тест-систем НИФ для диагностики ОРВИ производства DAKO Imagen и другой коммерческой фирмы по отношению к изоляции вирусов в культуре клеток

	DAKO Imagen + –	Коммерческая тест-система + –
Изоляция вирусов		
+	205 7	207 5
–	13 112	15 110
Специфичность, %	96,7	97,6
Чувствительность, %	89,6	88,0
% корреляции	94,1	94,1

тител, что значительно снижает специфичность методики, с чем мы и столкнулись в своей работе. При сопоставлении эффективности ПЦР-анализа и ПИФ были выбраны РС-инфекция (50 проб) и парагрипп (9 проб). Образцы для проведения ПЦР и ПИФ отбирались в первые дни заболевания (плюс-минус 24 ч), при этом наблюдалось полное расхождение результатов двух методик [19]. В настоящее время и в нашей стране стали появляться печатные издания, посвященные разработке моноклональных антител для диагностики ОРЗ [20, 21].

Примечательно, что к коммерческим тест-системам для быстрой диагностики на основании ИФА как в отношении антигенов (ИФА на АГ), так и антител (ИФА на АТ) – последние могут применяться не ранее 2-й нед заболевания, когда начинают вырабатываться антитела к возбудителю – также отмечается очень осторожное отношение. Они могут давать большой разброс по специфичности и чувствительности по сравнению с заявленными при разработке показателями. Так, в отношении Directigen RSV Test (Becton Dickinson) фирмой-производителем приводятся следующие показатели: чувствительность 93–97%, специфичность 90–97% по сравнению с культуральными методиками (<http://catalog.bd.com>). А в литературе встречаем другие данные, которые приведены в табл. 4.

Можно сделать вывод, что самые высокие показатели чувствительности и специфичности выявлены для RSV Testpack (ABBOTT), однако в других работах можно встретить более низкие цифры (чувствительность от 75%) [22–24]. В отношении некоторых подобных тест-систем можно встретить и более пугающие данные: чувствительность 36,5–54,5%, специфичность 82,1–98,5% [25].

Тест-системы для выявления антител в крови (серологическая диагностика) в нашей стране представлены на основе ИФА, РСК, РТГА, РН. Проводится раздельное выявление АТ классов А, М и G и определение диагностического нарастания титра антител в динамике заболевания не менее чем в четыре раза. На точность серологической диагностики во многом влияет снижение качества исследуемых сывороток, что зависит от температуры и длительности их хранения, а также методических погрешностей. Оценку результатов в каждом конкретном случае следует сочетать с анализом других лабораторных, клинических и эпидемиологических данных [26]. За рубежом существует формат ПИФ для выявления АТ в сыворотке крови, который по своим характеристикам сравним с РСК. ИФА тест-системы предпочтительнее к применению как более чувствительные [27, 28]. При сравнении результатов существующих коммерческих ИФА-тес-

Методы	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
SV/культура	94,3	96,9
SV/МИФ	86,4	92,6
Культура/ПИФ	84,9	94,3

Таблица 4. Сравнительные характеристики четырех вариантов ИФА на АГ по отношению к референс-методике

	DACO Rapide VRs	Directigen RSV test	RSV Testpack (ABBOTT)	VIDAS RSV ELISA test (bioMerieux)
Референс-метод: культуральный				
Чувствительность	75	80,6	86,2	87,2
Специфичность	67,8	61,3	77,7	82,1
Референс-метод : культуральный + VIDAS RSV ELISA test				
Чувствительность	79,2	82,6	87,9	
Специфичность	70,4	82,6	94,6	

тов с результатами ПЦР коэффициент совпадения результатов составил 95% [29]. Чувствительность ИФА выше, чем РСК и примерно совпадает с чувствительностью метода иммунофлюоресценции и реакции нейтрализации [15], кроме того, ИФА позволяет проводить типирование вирусов на подгруппы. Существенным недостатком всех этих тестов являются поздние сроки установления диагноза и необходимость забора крови в динамике (через 2 нед). Кроме того, ни одна из данных зарубежных тест-систем не зарегистрирована в России, что делает их недоступными к применению в нашей стране.

Итак, исходя из приведенных выше сведений, можно сделать следующее заключение:

- методом выбора или «золотого стандарта» диагностики ОРВИ могут быть как вирусологический, так и ПЦР;
- с целью исключить возможные ложноотрицательные ответы культуральных методик желательнее проводить их одновременно с МИФ;
- для исключения ложноположительных результатов МИФ нежелательно применение тест-систем с использованием поликлональных антител;
- методы быстрой диагностики, основанные на МИФ и ИФА на обнаружение АГ, могут применяться как скрининг-тесты самостоятельно, но с обязательной постановкой негативных проб на более чувствительных тест-системах, либо наличие или отсутствие вирусов у пациента должно быть подтверждено как минимум двумя различными методиками;
- для серодиагностики ОРВИ наиболее оптимальным методом является ИФА.

### Литература

- 1 Шарпапова О В. Проблемы инфекционной заболеваемости в России в новом тысячелетии. *Детские инфекции* 2004; 1: 4–5.
- 2 Фомин И.О., Гаспарян Е.С. *Инфекционные болезни*. Екатеринбург, 1993.
- 3 Stockton J., Ellis J., Savill M., et al. Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and Respiratory Syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998; 2990–5.
- 4 Lina B., Valette M., Foray S., et al. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during Winter 1994–1995. *J Clin Microbiol* Dec. 1996; 3007–3011.
- 5 Острые респираторные заболевания у детей: лечение и профилактика. Пособие для врачей. М.: МЗ РФ, Союз педиатров России, международный фонд охраны здоровья матери и ребенка, 2002; 70.
- 6 Приказ № 101-46 от 19 апреля 1995 года «О защите населения от гриппа и других ОРЗ». Министерство здравоохранения и медицинской промышленности РФ и ЦГСЭН РФ.
- 7 Gavie M., De Nicola L. Bronchiolitis screening tests.
- 8 Hibbitts S., Fox J.D. The application of molecular techniques to diagnosis of viral respiratory tract infections. *Rev Med Microbiol* 2002; 13(4): 177–85.
- 9 Gilbert L., Dakham A., Bone B., et al. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a RT-PCR panel. *J Clin Microbiol* 1996; 140–3.

10. Atmar R., Baxter B., Dominguez E., et al. Comparison of RT-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A Influenza Virus. *J Clin Microbiol* 1996; 2604–6.
11. Hu A., Colella M., Tam J., et al. Simultaneous Detection, subgrouping, and quantitation of RSV A and B by Real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 149–54.
12. Andeweg A., Bestebroer T., Huybregts M., et al. Improved detection of Rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed Nested RT-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 524–30.
13. Liolios L., Jenney A., Spelman D., et al. Comparison of a multiplex Reverse Transcription-PCR-Enzyme Hybridization Assay with Conventional Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for the Detection of seven viral Respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 2001; 2779–83.
14. Eugene-Ruellan G., Freymuth F., Banlou C., et al. Detection of RSV A and B and PIV 3 sequences in respiratory tract of infants by single PCR with primers targeted to L-Polymerase gene and differential hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 796–801.
15. Welliver R., Ogra P. *Infectious Diseases*. Gorbach N., Bartlett S., Blacklow J. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1998; 2594.
16. Meqdam M., Nasrallah G. Enhanced detection of Respiratory Syncytial virus by Shell Vial in children hospitalised with Respiratory Illnesses in Northern Jordan. *J Med Vir* 2000; 62: 518–23.
17. Carroll K.C. Minireview: Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections controversy and conundrums. *J Clin Microbiol* 2002; 3115–20.
18. Irmen K., Kelleher J. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses in a community hospital. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 396–403.
19. Мухина А.А., Шипулин Г.А., Кожевникова Е.Н. и др. ПЦР-диагностика респираторных вирусных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2002; 6: 51–5.
20. Монаенков А.О., Сологуб В.К., Соминина А.А. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к аденовирусу в иммуноферментных и иммунофлюоресцентных реакциях. *Вопросы вирусологии* 2000; 5: 30.
21. Суховецкая В.Ф., Монаенков А.О., Милькинт К.К. Этиологическая диагностика острых стенозирующих ларинготрахеитов у детей. 12 национальный конгресс по болезням органов дыхания, 2002.
22. Freydiere A., Goyard T., Ploton C., et al. Comparative evolution of 4 EIA versus cell culture for the rapid diagnosis of RSV infection in pediatric hospital. *ASM* 19–23, 62.
23. Myers D. The RSV TestPack EIA does not help clinical decision-making for children with possible RSV. Evidence-Based pediatrics site of University of Michigan Health System. <http://www.med.umich.edu>, 1999.
24. Falsey A., Walsh E. RSV infection in adults. *J Clin Microbiol* 2000; 371–84.
25. Pregliasco F., Puzelli S., Mensi C. Influenza virological surveillance in children: the use of the QuickVue rapid diagnostic test. *J Med Vir* 2004; 73: 269–73.
26. Карпунин Г.И., Карпунина О.Г. *Диагностика, профилактика и лечение ОРЗ*. СПб., 2000.
27. Чешик С.Г., Вартанян Р.В. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция: клиника, диагностика, лечение. *Детские инфекции* 2004; 1: 43–8.
28. Иммунореагенты для диагностических исследований. НИИ гриппа РАМН СПб., 2004.
29. Gottschalk J., Zbinden R., Kaempfer L., et al. Discrimination of Respiratory Syncytial viruses subgroups A and B by Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 41–3.