

Орлова С. В., Штыров А. А., Савинова О. В., Рудько Г. Ф.

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ И ОЦЕНКА ИХ ЗНАЧИМОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ РЕСПИРАТОРНЫМИ ВИРУСАМИ

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

Известно, что в общей структуре инфекционной патологии преобладают заболевания вирусной этиологии, при этом основными среди них являются острые вирусные респираторные заболевания. Их доля в структуре инфекционной патологии в Беларуси и России составляет более 90% [1].

Вирусы, вызывающие острые респираторные заболевания, относятся к разным таксономическим семействам, различаются по структуре и биологическим свойствам. Респираторные вирусы таксономически входят в семейства: РНК-содержащие *Orthomyxoviridae* (грипп А, В и С), *Paramyxoviridae* (парагрипп и респираторно-синтициальный вирус и также ДНК-содержащие *Adenoviridae* (аденовирус, серотипы группы В и С). Среди перечисленных вирусов, особо значимы в респираторной патологии являются вирусы гриппа А, В, парагриппа, респираторно-синтициальный вирус и аденовирус. Такое этиологическое многообразие инфекций, объединяемых термином «ОРВИ» а также сходство клинических проявлений затрудняет их диагностику [2].

Целью настоящей работы явилась разработка технологии получения комплекса диагностических наборов оценка их значимости в диагностике инфекций, вызываемых респираторными вирусами.

Как правило, диагностика вирусных инфекций осуществляется по двум основным направлениям. К первым (прямым) методам относят методы направленные на выявление вируса, его антигена или нуклеиновой кислоты; ко вторым – выявление специфических антител [2, 3].

Получены флуоресцирующие иммуноглобулины для определения антигенов вирусов гриппа А (штаммы H3N2 и H1N1), вируса В, респираторно-синтициального вируса (РС), аденовируса (АД) и парагриппа (1, 2 и 3 типов). В основу технологии получения диагностических иммуноглобулинов заложен этап выделения иммуноглобулинов из иммуноасцитической жидкости (ИАЖ) лабораторных животных, иммунизированных вирусами. Специфическая активность иммуноглобулинов зависит от титра антител в исходных ИАЖ. Для выделения иммуноглобулинов использовали ИАЖ с титром не менее 1:1024 в реакции нейтрализации. Важными этапами в технологии являются: реакция конъюгации антител с флуоресцирующим красителем (ФИТЦ), гель-хроматографическая очистка от свободного красителя, определение соотношения концентрации белок/ФИТЦ. Подобранные концентрации позволили получить флуоресцирующие иммуноглобулины с красящим титром 1:16 - 1:128. Эти препараты предназначены для диагностики инфекций в реакции иммунофлуоресценции (РИФ), которая является одним из распространенных способов диагностики антигенов вирусов ОРВИ.

Для диагностики вирусных инфекций, вызываемых АД и РС, разработана технология получения диагностических твердофазных иммуноферментных

тест-систем (ИФА) по детекции маркеров ранней инфекции (иммуноглобулины класса М) и поздней (иммуноглобулины класса G). Технология получения ИФА тест-систем включала важный этап накопления культурального вируса с титром не менее 3,0 lg ТЦИД₅₀/мл. Вирус использовали для сенсibilизации твердой фазы, предварительно подобрав оптимальные методы инактивации его и разные концентрации инактивированного вируса для сенсibilизации.

Получен набор ингредиентов для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для детекции ДНК аденовируса. Проведена разработка и дизайн праймеров к консервативным областям аденовируса, а также оптимизация концентрации всех ингредиентов ПЦР смеси. Оптимизация условий постановки ПЦР-РВ позволила выявлять до 10² копий геном-эквивалент вируса в одном миллилитре образца.

Все полученные наборы для диагностики инфекций, вызываемых респираторными вирусами, имеют коммерческий статус (табл.).

Перечень диагностических препаратов и методов диагностики инфекций, вызываемых респираторными вирусами

Препараты для диагностики инфекций, вызываемых вирусами	Диагностические методы		
	РИФ	ИФА (IgM, IgG)	ПЦР-РВ
гриппа А (штамм H3N2)	+	-	-
гриппа А (штамм H1N1)	+	-	-
гриппа В	+	-	-
респираторно-синцитиальный	+	+	-
Адено	+	+	+
парагрипп 1 тип	+	-	-
парагрипп 2 тип	+	-	-
парагрипп 3 тип	+	-	-

Выбор метода диагностики ОРВИ зависит от заданной цели исследования, что определяет вид биологического материала. Для анализа в РИФ чаще используют назофарингеальные смывы, в ИФА – сыворотка крови, в ПЦР – любой биологический материал.

При массовых исследованиях и для быстрого получения ответа наиболее приемлем РИФ. Метод специфичен, чувствителен, применяется для обследования большого количества проб, но следует иметь в виду, что при исследовании первичного материала может происходить гипердиагностика за счет неспецифического связывания с другими возбудителями респираторной группы, имеющие общие антигенные детерминанты и за счет незначительной контаминации микроорганизмами [4]. В настоящее время ИФА широко используется в диагностике инфекционных заболеваний благодаря высокой чувствительности и специфичности. Результаты этого метода воспроизводимы, и метод пригоден для массовых обследований. Возможность инструментальной оценки результатов устраняет фактор субъективности [5].

Эффективным способом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая высокоспецифична, воспроизводима, не дает перекрестов с гетерологичными нуклеиновыми кислотами. Этот метод позволяет, помимо диагностики, проводить исследования по мониторингу и молекулярно-биологи-

ческой характеристике вируса, по идентификации и определению групповой принадлежности [3].

В практическом здравоохранении применение всего комплекса методов в большинстве случаев затруднительно. Поэтому актуальным является вопрос о выборе 1-2 методов, обладающих наибольшей специфичностью, чувствительностью и соответствующих заданной цели исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Быстрая* диагностика гриппа и других ОРВИ иммунофлуоресцентным методом: метод. рекомендации МР N 0100/4434-06-34 от 18.04.2006. М., 2006.
2. *Носик, Н. Н.* Лабораторная диагностика вирусных инфекций / Н. Н. Носик, В. М. Стаханова // Клинич. микробиол. антимикроб. химиотер. 2000. № 2. С. 25-29.
3. *Информативность* различных методов лабораторной диагностики аденовирусной инфекции / С. В. Орлова [и др.] // Здравоохранение. 2010. № 12. С. 47-51.
4. *George, C. R.* Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses/ C. R. George, L. L. Minnich // J. Clin. Microbiol. 1987. Vol. 25. P. 355-357.
5. *Егоров, А. М.* Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Е. М. Гаврилов. М.: Высшая школа, 1999. 288 с.