

16. Riley R.S., Mahin E.J., Ross W., ed. Clinical applications of flow cytometry. New York: Igaku-Shoin; 1993.
17. Abakushina E.V. *Effect of carbohydrates presented on the target cells surface on cytolytic activity of human natural killer cells*. Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
18. Paradopoulos N.G., Dedoussis G.V.Z., Spanakos G., Gritzapis A.D., Baxevanis C.N., Paramichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 1994; 177: 101–11.
19. Saidov M.Z., Koval'chuk L.V. Using the principle of serial cell dilutions for the diagnosis of the activity of human natural killer cells. *Immunologiya*. 1986; 4: 76–8. (in Russian)
20. Packard B.Z., Telford W.G., Komoriya A., Henkart P.A. Granzyme B activity in target cells detects attack by cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.* 2007; 179: 3812–20.
21. Kovalenko E.I., Abakushina E.V., Telford W., Kapoor V., Korchagina E.Yu., Khaidukov S.V. et al. Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: A model system. *Histochem. Cell Biol.* 2007; 127 (3): 313–26.
22. Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevation of serum levels of soluble forms of stress-induced molecules MICA in oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina*. 2014; 3: 34–8. (in Russian)
23. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*. 2004; 294: 15–22.
24. Bryceson Y. T., March M. E., Barber D. F., Ljunggren H. G., Long E. O. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 1001–12.
25. Gonzalez V.D., Björkström N.K., Malmberg K.J., Moll M., Kuylenstierna C., Micha'elsson J. et al. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets. *J. Immunol. Methods*. 2008; 330: 64–74.
26. Marcenaro S., Gallo F., Martini S., Santoro A., Griffiths G. M., Arico M., et al. Analysis of natural killer-cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13-4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease. *Blood*. 2006; 108: 2316–23.
27. Bonavida B. NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity. *Crit. Rev. Oncog.* 2014; 19(1–2): 21–45.
28. Bryceson Y.T., Fauriat C., Nunes J.M., Wood S.M., Björkström N.K., Long E.O. et al. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2010; 612: 335–52.

Received 05.02.15

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.921.5+616.2-022.6]-078.33

Петрова Е.Р., Суховецкая В.Ф., Писарева М.М., Майорова В.Г., Сверлова М.В., Даниленко Д.М., Петрова П.А., Кривицкая В.З., Соминина А.А.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ БЫСТРЫХ ТЕСТОВ В ДИАГНОСТИКЕ ГРИППА А И РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Проведен анализ диагностических параметров коммерческих быстрых тестов (иммунохроматографических тестов (ИХТ) *VinaxNOW Influenza A&B* и *VinaxNOW RSV* (Alere, Scarborough Inc., США) и системы *tarIPOC* (ArcDia Int. Ltd., Финляндия)) при выявлении антигенов вируса гриппа А и респираторно-синцициального вируса (РСВ) в клинических материалах. Методами сравнения служили полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и выделение вирусов в культурах клеток. Исследование назофарингеальных мазков, полученных от 116 детей, показало, что чувствительность и специфичность детекции вируса гриппа А с помощью прибора *tarIPOC* при сравнении с ПЦР составили 93,8 и 99,0% соответственно при общем совпадении результатов двух методов 98,3%. При диагностировании РСВ-инфекции на приборе *tarIPOC* эти параметры составили по сравнению с ПЦР 77,3; 98,9 и 86,2%. Чувствительность, специфичность и общее совпадение результатов ИХТ *VinaxNOW* составили по сравнению с ПЦР 86,7; 100 и 96,2% соответственно при выявлении вируса гриппа А и 80,9; 97,4 и 91,6% соответственно при детекции РСВ. При сравнении с методом изоляции в культурах клеток чувствительность системы *tarIPOC* и ИХТ оказалась в 1,3–1,4 раза выше при детекции вируса гриппа А и в 1,7–2 раза при выделении РСВ. Статистически значимых различий между диагностическими параметрами, полученными для *tarIPOC* и ИХТ при диагностировании гриппа А и РСВ-инфекции, не выявлено. Исследованные диагностические системы *tarIPOC* и ИХТ могут успешно применяться для быстрой диагностики гриппа А и РСВ-инфекции в клинической практике.

Ключевые слова: быстрые диагностические тесты «у постели больного»; иммунохроматографические тесты; *tarIPOC*; полимеразная цепная реакция; грипп А; респираторно-синцициальная вирусная инфекция; назофарингеальные мазки.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 44–49.

Для корреспонденции: Петрова Екатерина Романовна, degidrataza@gmail.com

For correspondence: Petrova E.R., degidrataza@gmail.com

Petrova E.R., Sukhovetskaia V.F., Pisareva M.M., Maiorova V.G., Sverlova M.V., Danilenko D.M., Petrova P.A., Krivitskaia V.Z., Sominina A.A.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF QUICK TESTS IN DIAGNOSTIC OF INFLUENZA A AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRAL INFECTION IN CHILDREN

The research institute of influenza of Minzdrav of Russia, 197376 St. Petersburg, Russia

The analysis was implemented concerning diagnostic parameters of commercial quick tests (immune chromatographic tests BinaxNOW Influenza A&B and BinaxNow RSV, Alere, Scarborough Inc., USA) under detection of antigens of influenza virus A and respiratory syncytial virus in clinical materials. The polymerase chain reaction in real-time and isolation of viruses in cell cultures. The analysis of naso-pharyngeal smears from 116 children demonstrated that sensitivity and specificity of detection of influenza virus A using device mariPOC in comparison with polymerase chain reaction made up to 93.8% and 99.0% correspondingly at total concordance of results of both techniques as 98.3%. At diagnosing of respiratory syncytial virus using device mariPOC parameters made up to 77.3%, 98.9% and 86.2% as compared with polymerase chain reaction. The sensitivity, specificity and total concordance of results of immune chromatographic tests BinaxNOW in comparison of polymerase chain reaction made up to 86.7%, 100% and 96.2% correspondingly at detection of influenza virus A and 80.9%, 97.4% and 91.6% correspondingly at detection of respiratory syncytial virus. In comparison with isolation technique in cell cultures sensitivity of system mariPOC and immune chromatographic tests proved to be in 1.3-1.4 times higher at detection of influenza virus A and in 1.7-2 times higher in case of isolation of respiratory syncytial virus. There is no statistically significant differences between diagnostic parameters received for mariPOC and immune chromatographic tests at diagnosing influenza virus A and respiratory syncytial viral infection.

Key words: *quick diagnostic tests "at patient's bed"; immune chromatographic tests; mariPOC; polymerase chain reaction; influenza A; respiratory syncytial viral infection; naso-pharyngeal smears.*

The authors are deeply obliged to employees of firm "ArcDia Int.Ltd." (Turku, Finland) for presented opportunity of studying system and "AMTEO M" (Moscow) for support in mastering operations with the device mariPOC.

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (11): 44-49. (in Russ.)*

Введение. В России ежегодно регистрируется около 50 млн случаев инфекционных заболеваний. До 95% из них приходится на острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), включая грипп [1]. Помимо вирусов гриппа в структуре заболеваемости ОРВИ достаточно высока роль возбудителей иной этиологии, среди которых более чем в 20% случаев выявляются респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа и аденовирусы [2]. РСВ является одной из основных причин возникновения респираторной патологии у детей, особенно младшего возраста: 70% детей переносят РСВ-инфекцию (РСВИ) в первый год жизни. Согласно результатам метаанализа, число летальных случаев от гриппа и РСВИ в 2010 г. составило среди населения планеты 507 900 и 253 500 соответственно [3]. Частота летальных исходов от РСВИ, регистрируемая среди госпитализированных пациентов в возрасте до 18 лет, достигает в некоторых странах 33% и составляет около 37% при осложненном анамнезе [4].

Поскольку ОРВИ разной этиологии зачастую имеют сходную клиническую симптоматику, особенно на начальных этапах, высокую значимость приобретает совершенствование и развитие современных методов лабораторной дифференциальной диагностики. Быстрое определение причины ОРВИ позволяет назначить противовирусные препараты на ранних стадиях болезни, когда они наиболее эффективны, избежать назначения антибиотиков при вирусных заболеваниях, предупредить внутрибольничное распространение респираторных инфекций разной этиологии. В эпидемиологической практике быстрая расшифровка природы эпидемических вспышек позволяет определить тактику проведения противоэпидемических мероприятий и структуру экстренных превентивных мер в очагах заболеваний. В дополнение к этому необходимость дифференциальной диагностики РСВИ диктуется тем, что РСВ в значительно большей степени, чем другие часто встречающиеся респираторные вирусы, способствует развитию иммунопатологических проявлений, в том числе обструкции нижних дыхательных путей [5, 6], что является специфическим фактором риска, особенно для новорожденных.

Метод изоляции респираторных вирусов в культуре клеток – наиболее специфичный диагностический метод, который во многих лабораториях используется в качестве «золотого стандарта», несмотря на чувствительность, уступающую молекулярным методам, и высокую продолжительность анализа (от 3–10 дней для вируса гриппа и до 2–3 нед

для РСВ). Тем не менее выделение вирусов в культуре клеток – единственный способ получения новых штаммов с целью их дальнейшего изучения.

Молекулярные методы относятся к наиболее чувствительным методам диагностики ОРВИ. Чувствительность, так же как и специфичность, коммерческих тест-систем, представляющих собой различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), достигает 90–100% при диагностике гриппа А и РСВИ. При детекции вируса гриппа А чувствительность ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в 10^3 и 10^6 раз выше, чем при выявлении вирусных антигенов в культуре инфицированных клеток или иммуноферментном анализе соответственно [7]. Однако ПЦР – дорогой метод, требующий специального оборудования и обученного обслуживающего персонала. Анализ многостадийный и занимает достаточно длительное время: 2 дня и более при тестировании, помимо вирусов гриппа, других возбудителей ОРВИ.

В последние годы в области иммунодиагностики ОРВИ главное внимание уделяется разработке быстрых методов детекции вирусных антигенов в различных вариантах исполнения (иммунохроматографических, иммуносенсорных, флуорометрических), использующих достижения в области современной иммунохимии и биофизики. Огромными преимуществами тестов «у постели больного» являются их простота и возможность быстрого получения результатов (за 15–30 мин). Эти тесты, как правило, обладают достаточной специфичностью, хотя менее чувствительны, чем методы молекулярной диагностики [8].

К наиболее простым и доступным практическому здравоохранению относятся прежде всего иммунохроматографические тесты (ИХТ), основанные на принципе тонкослойной хроматографии и позволяющие визуально учитывать результаты реакции антиген–антитело без использования какого-либо оборудования.

При детекции антигенов вируса гриппа А непосредственно в клинических образцах наиболее часто используются коммерческие быстрые ИХТ BinaxNOW Influenza A&B (Alere, Scarborough Inc., США), Directigen EZ Flu A and B (Becton Dickinson, США), Quidel Quick Vue (Quidel, США). По данным различных авторов, чувствительность этих тестов при диагностике гриппа варьирует в пределах 56–84% при специфичности 97–100% в сравнении с ОТ-ПЦР в реальном времени [9]. По сравнению с методом выделения вируса гриппа А эти параметры составляют для данных ИХТ 65–100% и

92–100% соответственно. При этом эффективность анализа зависит от качества и сроков сбора клинических материалов, условий хранения, а также возраста пациентов [10].

При выявлении РСВ для ИХТ BinaxNOW RSV, Directigen RSV и Quick Vue RSV в сравнении с ОТ-ПЦР в реальном времени чувствительность и специфичность были определены в пределах 68–79 и 97–100% соответственно [11, 12]. При сравнении с выделением РСВ чувствительность и специфичность быстрых ИХТ составили 75–91 и 81–98% соответственно [13, 14]. Следует отметить, что эффективность быстрых тестов при диагностике РСВИ в значительной степени зависит от возраста пациента. Так, например, при одинаково высокой специфичности чувствительность ИХТ была в 1,5 раза выше при обследовании детей до 1 года жизни, чем пациентов более старшего возраста [11].

К новым средствам оперативной диагностики респираторных инфекций относится диагностическая система *magiPOC*, разработанная в Финляндии (ArcDia Int. Ltd.). Она отличается высокой производительностью и позволяет проводить одновременный анализ шести образцов на наличие антигенов восьми респираторных вирусов (вирусов гриппа А и В, аденовирусов, РСВ, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1–3-го типов). Предварительные результаты регистрируются через 20 мин, окончательные – через 2 ч. Принцип работы прибора основан на применении технологии двухфотонного возбуждения флуоресценции. Методика анализа включает использование микропланшетов, содержащих высушенную смесь реагентов: полимерных микросфер, покрытых вирусспецифическими антителами для захвата антигенов, и конъюгата противовирусных антител с флуоресцентной меткой для их детекции. Технология исключает необходимость стадий отмывания. В случае присутствия в клиническом образце респираторного патогена на поверхности микросфер образуются флуоресцентные иммунокомплексы, детектируемые автоматическим анализатором. Каждая микросфера сканируется индивидуально [15].

Целью настоящей работы являлся анализ диагностических параметров коммерческих быстрых тестов (ИХТ и системы *magiPOC*) при выявлении антигенов вируса гриппа А и РСВ в клинических материалах.

Материалы и методы. Клинические материалы. Для анализа были использованы назофарингеальные мазки, взятые в первые 3 дня ОРВИ у детей в возрасте от 9 дней до 14 лет, госпитализированных в отделение ОРВИ у детей (НИИ гриппа) в январе – апреле 2014 г.

Система *magiPOC*. Для забора клинического материала использовали стерильные одноразовые тампоны (Сорап, Италия, арт. 503CS01), которые помещали в сухом виде в специальные пробирки. Согласно инструкции производителя хранение образцов в таком виде допускалось в течение 2 сут при 4°C. Перед проведением анализа в пробирку добавляли 1,3 мл буферного раствора для образцов (RTI Sample Buffer), включенного в набор буферов, прилагаемых к прибору. Для высвобождения антигена в раствор содержимое пробирки перемешивали на вортексе в течение 10–15 с, после чего помещали в штатив прибора.

Быстрые ИХТ. В данной работе применяли два вида ИХТ: BinaxNOW Influenza A&B и BinaxNOW RSV (Alere, Scarborough Inc., США). Образец, ресуспендированный в RTI Sample Buffer, наносили на тест-полоску ИХТ в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Результат оценивали визуально по проявлению тест-линий.

В качестве методов сравнения для быстрых тестов использовали ПЦР и для части образцов выделение вирусов в культурах клеток MDCK и MA-104.

ОТ-ПЦР. Анализ проводили с использованием наборов реагентов АмплиСенс (Интерлабсервис, Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Для выделения РНК из клинических образцов использовали набор АмплиСенс РИБопреп, для проведения обратной транскрипции ви-

русной РНК – набор АмплиСенс Reverta. Для постановки ОТ-ПЦР в реальном времени использовали следующие системы: АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL, АмплиСенс® Influenza virus A type FL и АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL при анализе РНК вируса гриппа типа А, а также набор «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL», предназначенный для идентификации специфических фрагментов нуклеиновых кислот РСВ и других респираторных вирусов.

Изоляция вирусов в культуре клеток. Сбор клинических образцов и выделение из них вируса гриппа А в культуре клеток MDCK проводили согласно Методическим рекомендациям [16]. Для изоляции штаммов РСВ использовали культуру клеток MA-104. После нанесения на отмытую культуру содержащего вирус материала клетки инкубировали в бессывороточной среде альфа-МЕМ в течение 5–7 сут при 37°C до развития видимого цитопатогенного эффекта. Идентификацию выделенных штаммов вируса гриппа А и РСВ проводили с помощью реакции торможения гемагглютинации и ПЦР.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы DagStat. Для сопоставления диагностических параметров анализируемого метода и метода сравнения использовали следующие формулы:

$$\text{чувствительность метода} = \frac{a}{a + c};$$

$$\text{специфичность метода} = \frac{d}{b + d};$$

$$\text{общее совпадение результатов, полученных двумя методами} = \frac{a + d}{a + b + c + d},$$

где a – результаты, положительные по данным двух сравниваемых методов; b – результаты, отрицательные по методу сравнения, но положительные по данным анализируемого метода; c – результаты, положительные по методу сравнения, но отрицательные по данным анализируемого метода; d – результаты, отрицательные по обоим сравниваемым методам. Сравнение выборочных долей (диагностических параметров тест-систем) проводили с использованием точного критерия Фишера. Нулевые гипотезы отвергались при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Детекция вируса гриппа А. Из 116 проанализированных клинических образцов 20 оказались положительными при выявлении вируса гриппа А с помощью ПЦР, 15 из них также были определены как положительные в системе *magiPOC*. При этом из оставшихся 5 ПЦР-положительных материалов, которые были отрицательны по результатам *magiPOC*, 4 имели очень низкую вирусную нагрузку: вирус детектировали методом ПЦР только после 29–34 циклов амплификации. В процессе работы было показано, что прибор *magiPOC* эффективно выявлял вирус гриппа А в пробах с более высоким содержанием вируса (детекция возбудителя за 25 циклов амплификации), но менее регулярно – при необходимости большего числа циклов (см. рисунок, а).

Определенный нами порог чувствительности детекции вируса гриппа А соответствует результатам других авторов. Так, наибольшая чувствительность быстрых ИХТ была показана при анализе образцов, в которых вирус гриппа А выявлялся методом ПЦР в реальном времени до 21–25 циклов амплификации [12, 14]. Эффективность системы *magiPOC* при диагностике гриппа А в случае низкого содержания вируса в клинических образцах также снижена, что показано при сопоставлении результатов с данными прямой иммунофлуоресценции [17].

В связи с этим диагностическая эффективность системы была проанализирована нами с учетом порога вирусной нагрузки, определяемой ПЦР до 25 циклов амплификации.

При такой системе обсчета чувствительность и специфичность детекции вируса гриппа с помощью прибора *magiPOC* при сравнении с ОТ-ПЦР в реальном времени составили 93,8% (15/16 случаев) и 99% (99/100) соответственно, при общем совпадении результатов двух методов в 98,3% случаев (114/116).

Эффективность ИХТ *BinaxNOW Influenza A&B* была оценена в сравнении с результатами ПЦР при исследовании 53 образцов (15 из них были ПЦР-положительными до 25 циклов амплификации). Чувствительность ИХТ при этом составила 86,7% (13/15), специфичность – 100% (38/38). Общее совпадение результатов обоих методов составило 96,2% (51/53) (см. таблицу).

В дополнение к ПЦР эффективность быстрых тестов была оценена в сравнении с методом изоляции вируса гриппа А на культуре клеток MDCK. Параллельно было проанализировано 22 пробы, в 19 из них наличие вируса гриппа А подтвердилось с помощью ПЦР. Положительными по результатам изоляции на культуре клеток оказались 52,6% (10/19) ПЦР-положительных образцов, по данным *magiPOC* – 73,7% (14/19), по результатам ИХТ – 68,4% (13/19). Все ПЦР-негативные пробы были отрицательны также по результатам других методов.

Таким образом, чувствительность системы *magiPOC* и ИХТ при диагностике гриппа А оказалась в 1,3–1,4 раза выше, чем метода выделения вируса.

При сравнительном анализе 57 клинических образцов общее совпадение результатов *magiPOC* и ИХТ при детекции антигенов вируса гриппа А составило 98,2% (56/57).

Детекция РСВ. Анализ результатов, полученных с использованием системы *magiPOC*, показал, что эффективная

детекция антигенов РСВ наблюдалась для тех проб, где содержание вирусного материала было достаточным для выявления методом ПЦР за 21 цикл амплификации. При меньшем содержании вируса результаты в системе *magiPOC* были отрицательными (см. рисунок, б). Эти данные соответствуют результатам других исследований, которые также показали, что при диагностике РСВИ максимальная эффективность быстрых тестов достигалась при анализе образцов с вирусной нагрузкой, выявляемой ПЦР в реальном времени до 21 цикла амплификации [14].

Показатели чувствительности и специфичности диагностирования РСВИ на приборе *magiPOC* по сравнению с ОТ-ПЦР в реальном времени (в пределах 21 цикла амплификации) составили 77,3% (17/22) и 98,9% (93/94) соответственно, при общем совпадении результатов 86,2% (100/116).

Для оценки эффективности детекции РСВ с помощью ИХТ *BinaxNOW RSV* проведено параллельное исследование 60 клинических образцов, 21 из которых оказался ПЦР-положительным (при вирусной нагрузке, выявляемой до 21 цикла амплификации). По результатам анализа были определены следующие характеристики ИХТ по сравнению с ПЦР: чувствительность 80,9% (17/21), специфичность 97,4% (38/39), общее совпадение результатов 91,6% (55/60).

Итоги сравнения результатов двух быстрых тестов с данными ОТ-ПЦР в реальном времени представлены в таблице.

В дополнение к вышеизложенному 33 образца были проанализированы на наличие РСВ методом изоляции в культуре клеток. Было выделено 6 штаммов РСВ (18,2% исследованных образцов). По результатам *magiPOC* положительными оказались 10 (30,3%) клинических материалов. При этом в четырех образцах, отрицательных по выделению РСВ, но положительных по результатам *magiPOC*, наличие РСВ было подтверждено ПЦР.

По результатам ИХТ положительными оказались 12 (36,4%) из 33 исследованных образцов, из них 6 совпали с методом изоляции вируса в культуре клеток, остальные 6 были подтверждены результатами ПЦР.

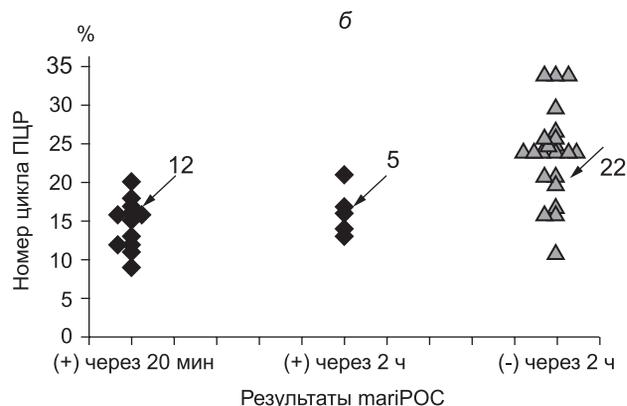
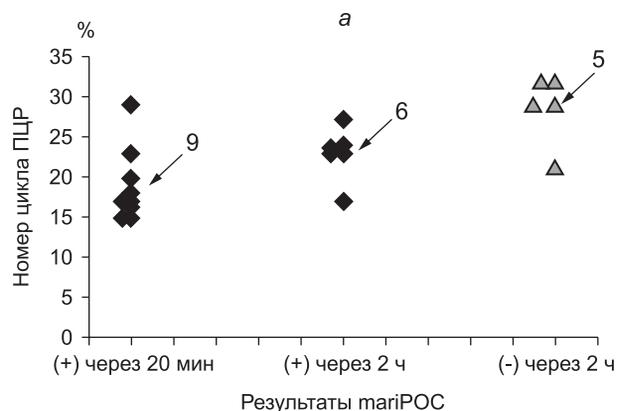
Таким образом, чувствительность системы *magiPOC* и ИХТ при диагностике РСВИ превышала показатель метода изоляции в 1,7–2 раза.

Для сравнения быстрых тестов между собой при детекции РСВ параллельно проанализированы материалы, полученные от 61 пациента (37 ПЦР-положительных и 24 ПЦР-отрицательных образца). Общее совпадение результатов *magiPOC* и ИХТ составило 88,5% (54/61).

Статистически значимых различий между диагностическими параметрами, полученными при использовании *magiPOC* и ИХТ при диагностировании гриппа А или РСВИ, не выявлено.

При диагностике вирусных инфекций метод ПЦР является самым чувствительным из ныне существующих. Однако для проведения ПЦР требуются специальные условия (ПЦР-боксы, дорогостоящее оборудование) и высококвалифицированные кадры. Кроме того, при сверхчувствительности метода не исключена опасность контаминации и получения ложноположительных результатов, а также регистрации хронических инфекций, не связанных с данной ОРВИ.

Выделение респираторных вирусов в культуре клеток – наиболее доказательный и специфичный метод диагностики ОРВИ. Его использование имеет особое значение для выделения новых современных вариантов РСВ. Недостатком метода является его длительность. Кроме того, для его успешного проведения требуется наличие инфекционного вируса в клинических материалах. Так, эффективность выделения РСВ снижалась на 22% при транспортировке проб в лабораторию по сравнению с нанесением на клетки непосредственно у постели больного [18]. Дополнительные трудности наблюдаются при выделении РСВ из проб, полученных от взрослых и особенно от пожилых пациентов, поскольку ко-



- ◆ Образцы положительные в обоих тестах
- ▲ Образцы положительные в ПЦР, но отрицательные в *magiPOC*

Сравнение результатов ОТ-ПЦР в реальном времени и *magiPOC* при детекции вируса гриппа А (а) и РСВ (б).

Результаты сравнительного анализа быстрых тестов (система *magiPOC* и ИХТ *BinaxNOW*) и ОТ-ПЦР в реальном времени при диагностировании гриппа А и РСВИ у детей

Тест	Численность группы	Детектируемый вирус	Число положительных (+) и отрицательных (-) результатов			Диагностические параметры в сравнении с ОТ-ПЦР в реальном времени, %		
			быстрый тест	ОТ-ПЦР		чувствительность	специфичность	общее совпадение результатов двух методов
				+	-			
<i>magiPOC</i>	116	Вирус гриппа А	+	15	1	93,8	99,0	98,3
			-	1	99			
	116	PCV	+	17	1	77,3	98,9	86,2
			-	5	93			
ИХТ	53	Вирус гриппа А	+	13	0	86,7	100	96,2
			-	2	38			
	60	PCV	+	17	1	80,9	97,4	91,6
			-	4	38			

личество вирусных частиц в клинических материалах у них значительно ниже (10^3 БОЕ/мл), чем у детей (10^6 БОЕ/мл), а длительность выделения вируса из инфицированных клеток в среду – меньше [19].

Широкое применение быстрых тестов «у постели больного» открывает огромные перспективы в решении задач практического здравоохранения. Несомненными преимуществами таких тестов, как ИХТ и система *magiPOC*, являются быстрота получения результатов, простота исполнения, при которой достаточно квалификации обученного лаборанта. Дополнительным преимуществом прибора *magiPOC* является возможность одновременной детекции значительного числа респираторных патогенов.

Результаты проделанной нами работы свидетельствуют о высокой эффективности быстрых тестов (система *magiPOC*, ИХТ *BinaxNOW* Influenza A&B и *BinaxNOW* RSV), чувствительность которых при детекции вируса гриппа А и РСВ превышала показатели метода изоляции вирусов в культуре клеток.

Полученные данные по чувствительности и специфичности систем согласуются с ранее опубликованными. Так, при сравнении с ПЦР чувствительность детекции вируса гриппа А и РСВ в назофарингеальных мазках детей 0–16 лет на приборе *magiPOC* составила 71 и 89% соответственно при 100% специфичности [20]. Анализ аспириатов, полученных от пациентов в возрасте до 18 лет, показал, что при 98% специфичности чувствительность системы *magiPOC* в сравнении с ПЦР составила при детекции вируса гриппа А и РСВ 67 и 78% соответственно [21].

Для ИХТ *BinaxNOW* Influenza A&B при диагностике гриппа А в сравнении с ПЦР были показаны чувствительность 76–84% и специфичность 97–100% [9, 22]. При детекции РСВ у детей младшего возраста данные показатели составили для ИХТ *BinaxNOW* RSV 79 и 97% соответственно [11].

Заключение. Таким образом, исследованные диагностические системы *magiPOC*, ИХТ *BinaxNOW* Influenza A&B и ИХТ *BinaxNOW* RSV могут применяться для быстрой диагностики гриппа А и РСВИ в клинической практике. При этом следует отметить, что отрицательный результат, полученный примерно в 20–30% рассмотренных случаев, не доказывает полного отсутствия инфекции, поскольку может быть следствием низкого уровня вирусной репродукции в верхних отделах респираторного тракта.

*Авторы работы приносят глубокую благодарность сотрудникам фирмы ArcDia Int. Ltd. (г. Турку, Финляндия) за предоставленную возможность исследования системы и ЗАО «АМТЕО М» (г. Москва) за помощь в освоении работ с прибором *magiPOC*.*

ЛИТЕРАТУРА

- Карпова Л.С., Ишкина Е.Р., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Забайкин А.В. Смертность от соматических и инфекционных заболеваний и ее корреляция с заболеваемостью гриппом и ОРВИ населения Санкт-Петербурга (2004–2010 гг). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; 4: 29–36.
- Соминина А.А., Грудинин М.П., Еропкин М.Ю., Смородинова Е.А., Писарева М.М., Комиссаров А.Б. и др. Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ по гриппу. *Вопросы вирусологии*. 2012; 6: 17–21.
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. 2012; 380: 2095–128.
- Welliver R.C., Checchia P.A., Bauman J.H., Fernandes A.W., Mahadevia P.J., Hall C.B. Fatality rates in published reports of RSV hospitalizations among high-risk and otherwise healthy children. *Curr. Med. Res. Opin.* 2010; 26: 2175–81.
- Falsey A.R., Cunningham C.K., Barker W.H., Kouides R.W., Yuen J.B., Menegus M. et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* 1995; 172: 389–94.
- Byeon J.H., Lee J.C., Choi I.S., Yoo Y., Park S.H., Choung J.T. Comparison of cytokine responses in na-sopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections. *Acta Paediatr.* 2009; 98: 725–30.
- Goldenberg S.D., Edgeworth J.D. The Enigma ML FluAB-RSV assay: a fully automated molecular test for the rapid detection of influenza A, B and respiratory syncytial viruses in respiratory specimens. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2015; 15: 23–32.
- Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И., ред. Соминина А.А., Кривицкая В.З., Иванова И.А. Иммунодиагностика. Современные препараты и методы. *Грипп. Эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика*. М.: Медицинское информационное агентство; 2012: 129–53.
- Busson L., Hallin M., Thomas I., De Foor M., Vandenberg O. Evaluation of 3 rapid influenza diagnostic tests during the 2012–2013 epidemic: influences of subtype and viral load. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 80: 287–91.
- Gavin P. J., Thomson R.B. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2003; 4:151–72.
- Miemyk K., Bulkow L., DeByle C., Chikoyak L., Hummel K.B., Hennessy T. et al. Performance of a rapid antigen test (Binax NOW® RSV) for diagnosis of respiratory syncytial virus compared with real-time polymerase chain reaction in a pediatric population. *J. Clin. Virol.* 2011; 50: 240–3.
- Rath B., Tief F., Obermeier P., Tuerk E., Karsch K., Muehlhans S. et al. Early detection of influenza A and B infection in infants and children using conventional and fluorescence-based rapid testing. *J. Clin. Virol.* 2012; 55: 329–33.

13. orek A.P., Clemens S.H., Gaskins V.K., Aird D.Z., Valsamakis A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 1105–7.
14. Tuttle R., Weick A., Schwarz W.S., Chen X., Obermeier P., Seeber L. et al. Evaluation of novel second-generation RSV and influenza rapid tests at the point of care. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014.
15. Koskinen J.O., Vainionpää R., Meltola N.J., Soukka J., Hänninen P.E., Soini A.E. Rapid method for detection of influenza a and B virus antigens by use of a two-photon excitation assay technique and dry-chemistry reagents. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 3581–8.
16. Соминина А.А. Методические рекомендации. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. С.-Петербург; 2006.
17. Tuuminen T., Suomala P., Koskinen J.O. Evaluation of the automated multianalyte point-of-care mariPOC® test for the detection of influenza A virus and respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 2013; 85: 1598–601.
18. Falsey A.R., McCann R.M., Hall W.J., Criddle M.M. Evaluation of four methods for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in older adults *J. Am. Geriatr. Soc.* 1996; 44: 71–3.
19. Englund J.A., Piedra P.A., Jewell A., Patel K., Baxter B.B., Whimbey E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1649–53.
20. Ivaska L., Niemelä J., Heikkinen T., Vuorinen T., Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection *J. Clin. Virol.* 2013; 57: 136–40.
21. Brotons P., Launes C., Inigo M., Peris N., Selva L., Muñoz-Almagro C. Performance of a rapid multi-analyte 2-photon excitation assay in children with acute respiratory infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 79: 190–3.
22. Chan M.C., Lee N., Ngai K.L., Leung T.F., Chan P.K. Clinical and virologic factors associated with reduced sensitivity of rapid influenza diagnostic tests in hospitalized elderly patients and young children. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 497–501.
8. Kiselev O.I., Tsybalova L.M., Pokrovskiy V.I., eds. Sominina A.A., Krivitskaya V.Z., Ivanova I.A. Immunodiagnostics. Modern drugs and methods. *Influenza. Epidemiology, diagnostics, treatment, prevention. [Gripp. Epidemiologiya, diagnostika, lechenie, profilaktika]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012: 129–53. (in Russian)
9. Busson L., Hallin M., Thomas I., De Foor M., Vandenberg O. Evaluation of 3 rapid influenza diagnostic tests during the 2012–2013 epidemic: influences of subtype and viral load. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 80: 287–91.
10. Gavin P. J., Thomson R.B. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. *Clinical and Applied Immunology Reviews.* 2003; 4: 151–72.
11. Miernyk K., Bulkow L., DeByle C., Chikoyak L., Hummel K.B., Hennessy T. et al. Performance of a rapid antigen test (Binax NOW® RSV) for diagnosis of respiratory syncytial virus compared with real-time polymerase chain reaction in a pediatric population. *J. Clin. Virol.* 2011; 50: 240–3.
12. Rath B., Tief F., Obermeier P., Tuerk E., Karsch K., Muehlhans S. et al. Early detection of influenza A and B infection in infants and children using conventional and fluorescence-based rapid testing. *J. Clin. Virol.* 2012; 55: 329–33.
13. Borek A.P., Clemens S.H., Gaskins V.K., Aird D.Z., Valsamakis A. Respiratory syncytial virus detection by Remel Xpect, Binax Now RSV, direct immunofluorescent staining, and tissue culture *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 110–7.
14. Tuttle R., Weick A., Schwarz W.S., Chen X., Obermeier P., Seeber L. et al. Evaluation of novel second-generation RSV and influenza rapid tests at the point of care. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014.
15. Koskinen J.O., Vainionpää R., Meltola N.J., Soukka J., Hänninen P.E., Soini A.E. Rapid method for detection of influenza a and B virus antigens by use of a two-photon excitation assay technique and dry-chemistry reagents. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 3581–8.
16. Sominina A.A. *Methodical recommendations. Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification.* Saint-Petersburg; 2006. (in Russian)
17. Tuuminen T., Suomala P., Koskinen J.O. Evaluation of the automated multianalyte point-of-care mariPOC® test for the detection of influenza A virus and respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 2013; 85: 1598–601.
18. Falsey A.R., McCann R.M., Hall W.J., Criddle M.M. Evaluation of four methods for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in older adults *J. Am. Geriatr. Soc.* 1996; 44: 71–3.
19. Englund J.A., Piedra P.A., Jewell A., Patel K., Baxter B.B., Whimbey E. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1649–53.
20. Ivaska L., Niemelä J., Heikkinen T., Vuorinen T., Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection *J. Clin. Virol.* 2013; 57: 136–40.
21. Brotons P., Launes C., Inigo M., Peris N., Selva L., Muñoz-Almagro C. Performance of a rapid multi-analyte 2-photon excitation assay in children with acute respiratory infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 79: 190–3.
22. Chan M.C., Lee N., Ngai K.L., Leung T.F., Chan P.K. Clinical and virologic factors associated with reduced sensitivity of rapid influenza diagnostic tests in hospitalized elderly patients and young children. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 497–501.

Поступила 20.04.15

REFERENCES

1. Karpova L.S., Ishkina E.R., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Zabaykin A.V. Mortality from somatic and infectious diseases and its correlation with the incidence of influenza and ARD among Saint-Petersburg population (2004–2010). *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2012; 4: 29–36. (in Russian)
2. Sominina A.A., Grudin M.P., Erokin M.Yu., Smorodintseva E.A., Pisareva M.M., Komissarov A.B. et al. Development of Influenza Surveillance in Russia in the system of the National Center of WHO on Influenza. *Voprosy virusologii.* 2012; 6: 17–21. (in Russian)
3. Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet.* 2012; 380: 2095–128.
4. Welliver R.C., Checchia P.A., Bauman J.H., Fernandes A.W., Mahadevia P.J., Hall C.B. Fatality rates in published reports of RSV hospitalizations among high-risk and otherwise healthy children. *Curr. Med. Res. Opin.* 2010; 26: 2175–81.
5. Falsey A.R., Cunningham C.K., Barker W.H., Kouides R.W., Yuen J.B., Menegus M. et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* 1995; 172: 389–94.
6. Byeon J.H., Lee J.C., Choi I.S., Yoo Y., Park S.H., Choung J.T. Comparison of cytokine responses in nasopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections. *Acta Paediatr.* 2009; 98: 725–30.
7. Goldenberg S.D., Edgeworth J.D. The Enigma ML FluAB-RSV as-

Received 20.04.15