

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Дмитрюкова М.Ю.¹, Малтызова М.И.¹, Голод А.А.¹, Комиссарова К.С.², Сенина М.Е.^{1,3}, Гуштин А.Е.^{3,4}

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ 13-ТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНО-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ООО «НекстБио», 111394, Москва, Россия;

²ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», 197376, Санкт-Петербург, Россия;

³ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы», 119071, г. Москва, Россия;

⁴ООО «Интерлабсервис», 115035, Москва, Россия

Респираторно-вирусные инфекции являются основной причиной недееспособности экономически активного населения, нередко приводят к тяжелым осложнениям и летальным исходам, особенно у новорожденных детей, пожилых и иммунокомпрометированных лиц. Свой вклад в снижение заболеваемости и смертности от респираторных инфекций может внести своевременная и точная диагностика возбудителей ОРВИ. Цель данного исследования – разработка и валидация наборов реагентов для одновременного выявления 13-ти основных возбудителей респираторно-вирусных инфекций, совместно с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот. Были протестированы стандартные образцы с известной концентрацией для определения аналитических характеристик набора, а также 162 образца биологического материала, содержащие возбудителей ОРВИ, из коллекции НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева в сравнении с набором RespiFinder 2Smart (PathoFinder; Нидерланды). Аналитическая чувствительность набора составила 500 копий/мл для всех выявляемых вирусов, за исключением коронавируса человека NL63, для которого минимальная выявляемая концентрация определена как 1000 копий/мл. Показано отсутствие перекрестных реакций с другими микроорганизмами и вирусами, обнаруживаемыми в дыхательных путях, а также с ДНК человека. При использовании набора сравнения RespiFinder 2Smart, наилучшая сходимость показана для аденовируса и метапневмовируса (коэффициент каппа Коэна больше 0,81). Наименьшая сходимость результатов – у риновируса (умеренное согласие, коэффициент каппа Коэна 0,57). При этом дискордантные образцы были положительны в тестируемом наборе и отрицательны в RespiFinder 2Smart. Таким образом, разработанный набор «АмплиПрайм ОРВИ-комплекс» показал высокую чувствительность и специфичность относительно выявляемых патогенов, хорошую сходимость результатов с набором сравнения, а также небольшое время, затрачиваемое на полный цикл анализа. Ключевые слова: острые респираторно-вирусные инфекции; полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Дмитрюкова М.Ю., Малтызова М.И., Голод А.А., Комиссарова К.С., Сенина М.Е., Гуштин А.Е. Валидация набора реагентов для одновременного выявления 13-ти возбудителей острых респираторно-вирусных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 769-774. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-769-774>

Для корреспонденции: Дмитрюкова Марина Юрьевна, канд. биол. наук, руководитель отдела разработки новой продукции ООО «НекстБио»; e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 25.09.2023

Принята к печати 30.10.2023

Опубликовано 00.12.2023

Dmitryukova M.Yu.¹, Maltysova M.I.¹, Golod A.A.¹, Komissarova K.S.², Senina M.E.^{1,3}, Guschin A.E.^{3,4}

VALIDATION OF THE REAGENT KIT FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF 13 MAIN VIRAL RESPIRATORY PATHOGENS

¹“NextBio” LLC, 111394, Moscow, Russia;

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, St. Petersburg, Russia;

³ Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, 119071, Moscow, Russia;

⁴“Interlabservice” LLC, 115035, Moscow, Russia

Respiratory infections are the main cause of temporary inability of economically active population, and increase risk of complications and fatal outcome in newborn, elderly and immunocompromise people. Appropriate and precise detection of respiratory pathogens should reduce morbidity and mortality of acute respiratory infections. The aim of this study was to develop and validate the reagent kit for simultaneous detection of 13 main respiratory pathogens combined with automatic instruments for nucleic acids purification. The quantified standardize control samples were tested for analytical characteristics, and 162 biological samples containing respiratory pathogens from Smorodintsev Research Institute of Influenza collection of were tested against RespiFinder 2Smart. Analytical sensitivity was 500 copies/ml for all identified pathogens except human coronavirus NL63 (1000 copies/ml). No cross-reaction with microorganisms and viruses from respiratory tract, as well as human DNA was shown. The highest agreement between tested kit and RespiFinder was shown for adenovirus and metapneumovirus detection (Cohen's kappa greater than 0.81), and lowest – for rhinovirus (mild agreement, Cohen's kappa 0.57). In last case discordant result were positive with tested kit and negative with RespiFinder kit.

Thus, the developed kit has shown high analytical sensitivity and specificity, good agreement between results obtained by tested and comparison kits, as well as short time for full analysis cycle.

Key words: acute respiratory infection; polymerase chain reaction.

For citation: Dmitryukova M.Yu., Maltysova M.I., Golod A.A., Komissarova K.S., Senina M.E., Guschin A.E. Validation of the reagent kit for simultaneous detection of 13 main viral respiratory pathogens. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12):769-774 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-769-774>

For correspondence: Dmitryukova M.Yu., PhD, e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

Information about authors:

Dmitryukova M.Y., <https://orcid.org/0000-0001-6050-2393>;
Maltysova M.I., <https://orcid.org/0000-0003-3102-4972>;
Golod A.A. <https://orcid.org/0000-0002-4058-2514>;
Komussarova K.S. <https://orcid.org/0000-0002-1465-5548>;
Senina M.E. <https://orcid.org/0000-0002-8185-4459>;
Guschin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-0399-1167>.

Acknowledgments. The study had no sponsor support.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 25.09.2023

Accepted 30.10.2023

Published 00.12.2023

Введение. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются самыми распространенными причинами недееспособности населения. Экономический ущерб в 2022 году от острых инфекций верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации, без учета COVID-19, составил 935 млрд. рублей, или 93% всей экономической значимости инфекционных заболеваний [1].

К наиболее частым возбудителям ОРВИ относятся риновирус, респираторно-синцитиальный вирус (по новой классификации – ортопневмовирус человека), метапневмовирус, вирусы парагриппа 1-4-го типа, коронавирусы человека, аденовирус и бокавирусы человека.

В большинстве случаев респираторные инфекции ограничиваются поражением верхних дыхательных путей и проходят самостоятельно, но в некоторых случаях способны прогрессировать с поражением нижних дыхательных путей и развитием бронхолита, пневмонии. В частности, вирусы парагриппа 1, 2 и 3-го типов являются основной причиной крупа, бронхолита и пневмонии у младенцев и маленьких детей, и являются одной из главных причин госпитализации детей в возрасте до пяти лет [2]. Риновирусы редко вызывают осложнения, однако более 50% случаев ОРВИ у взрослых ассоциированы именно с ними [3].

Респираторные инфекции в раннем возрасте повышают риск развития астмы у предрасположенных лиц, и в дальнейшем ее обострение [4]. В первую очередь, это характерно для респираторно-синцитиального вируса [5], метапневмовируса [6] и риновируса [7]. К осложнениям со стороны сердечно-сосудистой системы могут приводить все респираторные вирусы, за счет развития гипоксии и вызванной ей легочной гипертензии, либо поражение носит специфический характер, в частности, аденовирус является потенциальным триггером миокардита и кардиомиопатии, за счет репликации в кардиомиоцитах [8]. Есть сообщения о метапневмовирус-ассоциированном поражении ЦНС [9].

Молекулярные методы выявления возбудителей инфекционных болезней являются наиболее быстрыми и дешевыми для определения этиологии заболевания.

Цель работы - разработка набора реагентов для выявления основных возбудителей ОРВИ в биологическом материале методом ОТ-ПЦР совместно с полным циклом автоматической экстракции и приготовлением ПЦР смеси, а также его валидация относительно набора RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды).

Материал и методы. Амплификация с обратной транскрипцией. Набор реагентов «Амплипрайм ОРВИ-комплекс» предназначен для одновременного выявления 13-ти распространенных возбудителей инфекций респираторного тракта – вирусов парагриппа 1 - 4 типов, риновируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавирусов 229E, NL63, HKU1 и OC43, метапневмовируса, аденовируса и бокавируса. Гены – мишени представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Мишени для выявления 13-ти возбудителей ОРВИ

Возбудитель	Ген-мишень
Вирусы парагриппа 1 - 4 типа, респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы 229E, NL63, OC43	Ген нуклеокапсида (N gene)
Коронавирус HKU1	Ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp gene)
Риновирус	Сайт прикрепления рибосомы (IRES)
Метапневмовирус	Ген белка слияния (F gene)
Аденовирус	Ген гексона (H gene)
Бокавирус	Левый нетранслируемый участок (5'UTR)

Определение аналитической чувствительности, повторяемости и воспроизводимости. Аналитические характеристики набора определяли с использованием стандартных образцов предприятия (СОП), представляющих собой модифицированные РНК-содержащие ms2-фаги, несущие фрагменты генома выявляемых вирусов (парагриппа 1-4-го типов, риновируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавирусов 229E,

NL63, HKU1 и OC43, метапневмовируса), а также ДНК-содержащие плазмиды, несущие фрагмент генома бокавируса и аденовируса. Стандартные образцы разводили в биологическом материале (мазки из рото- и носоглотки), забранном в транспортную среду для респираторных мазков (АмплиПрайм® ТСР, ООО «НекстБио», Россия, РУ № ФСР 2012/14200). Биологический материал не содержал РНК выявляемых вирусов.

Для определения чувствительности были протестированы разведения СОП в концентрации 5000 копий/мл в пяти повторах, 1000 и 500 копий/мл в 20 повторах каждого возбудителя.

Для определения повторяемости и воспроизводимости результатов анализа стандартные образцы были разведены до концентрации 1×10^4 копий/мл в биологическом материале, не содержащем нуклеиновые кислоты выявляемых патогенов. Полученные модельные образцы были протестированы в 16 повторах для определения повторяемости на одном приборе в один день, и 32 повтора в разные дни и на разных приборах.

Экстракция была проведена с использованием набора для экстракции нуклеиновых кислот «Магно-Прайм® ФАСТ-Р» (ООО «НекстБио», Россия), методика с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария, рег. удостоверение № РЗН 2018/6981 от 05.04.2018).

Концентрация ms2-фагов и плазмид были определены методом цифровой ПЦР с использованием прибора QuantStudio 3D (Thermo Scientific, США).

Определение аналитической специфичности и

влияния интерферирующих веществ. Для определение специфичности выявления заявленных вирусов, был протестирован биологический материал (мазки из рото- и носоглотки), содержащий следующие патогены: вирусы гриппа А серотипы H5N1, H3N2, H0N1, H2N2, H7N9, вирус гриппа В (линии Виктория и Ямагата), *P. aeruginosa*, *M. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *H. influenza*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*

Для оценки влияния интерферирующих веществ в исследуемые образцы были внесены муцин (SigmaAldrich, США) в концентрации 0,23 мг/100 мкл, гемоглобин (SigmaAldrich, США), 0,20 ммоль / 100 мкл, мирамистин (Инфамед К, Россия), 0,001% действующего вещества в 100 мкл), хлоргексидин (Биоген НПЦ, Россия), 0,5% действующего вещества в 100 мкл.

Набор сравнения. В качестве набора сравнения использован набор реагентов RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды). Набор позволяет выявлять 20 вирусных патогенов: вирусы гриппа А (с типированием пандемического варианта 2009 года H1N1pdm09), гриппа В, респираторно-синцитиальный вирус типы А и В, метапневмовирус, риновирус (энтеровирус), аденовирус, вирусы парагриппа 1-4 типов, бокавирус, коронавирусы человека NL63/HKU1 (без типирования), коронавирусы OC43, 229E, SARS-CoV-2 и MERS. Кроме того, в панель включены 4 бактериальных возбудителя – *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis*. Метод основан на анализе кривой плавления ампликонов, полученных в ходе ПЦР с обратной транскрипцией.

Было протестировано 162 образца, содержащие воз-

Таблица 2

Определение аналитической чувствительности

Мишень	5000 копий/мл, 5 повторов		1000 копий/мл, 20 повторов		500 копий/мл, 20 повторов	
	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)
Вирус парагриппа 1-го типа	5	31,50 (31,19-31,81)	20	33,95 (33,77-34,13)	20	35,06 (34,85-35,27)
Вирус парагриппа 2-го типа	5	31,80 (31,60-32,00)	20	34,40 (34,28-34,52)	20	35,43 (35,23-35,62)
Вирус парагриппа 3-го типа	5	33,42 (33,23-33,62)	20	36,43 (35,87-36,41)	20	37,82 (37,47-38,18)
Вирус парагриппа 4-го типа	5	31,08 (30,96-31,19)	20	33,54 (33,42-33,65)	20	34,45 (34,28-34,63)
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	5	30,81 (30,40-31,22)	20	32,93 (32,30-33,56)	20	34,23 (33,37-35,09)
Риновирус	5	33,46 (33,03-33,88)	20	35,98 (35,58-36,38)	18	38,83 (38,43-39,23)
Коронавирус 229E	5	34,33 (34,03-34,62)	20	36,85 (36,63-37,06)	20	37,94 (37,66-38,22)
Коронавирус NL63	5	36,50 (36,09-36,90)	18	38,80 (37,93-39,63)	13	39,25 (38,55-39,95)
Коронавирус HKU1	5	33,63 (33,53-33,72)	20	36,40 (36,22-36,59)	20	37,41 (37,17-37,64)
Коронавирус OC43	5	34,36 (33,89-34,82)	20	36,85 (36,49-37,21)	19	37,85 (37,23-37,93)
Метапневмовирус	5	31,62 (31,34-31,90)	20	34,08 (31,00-34,15)	20	35,14 (34,97-35,31)
Аденовирус	5	31,50 (31,40-31,59)	20	34,05 (33,79-34,31)	20	35,10 (34,69-35,50)
Бокавирус	5	30,60 (30,54-30,66)	20	32,84 (32,67-33,00)	20	34,12 (33,86-34,37)

будителей ОРВИ из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, г. Санкт-Петербург. Образцы собирались в разное время и хранились при температуре -80 °С. Тестирование проводили параллельно двумя наборами, согласно инструкции по применению.

Этические аспекты. Биологический материал, использованный для проведения работы, был получен после значимых исследований. Дизайн исследования не был связан с риском для пациентов, и не оказывал влияние на их права и благополучие, способ получения материала не позволял провести идентификацию лица, от которого данный материал был получен. Исходя из

этого, одобрение этического комитета не требовалось.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО Excel (пакета MS Office, Microsoft, США).

Результаты. Аналитические характеристики набора были определены с использованием модельных образцов, представляющими собой разведения искусственных конструкций, содержащих фрагменты геномов выявляемых вирусов, в негативном биологическом материале. Результаты определения чувствительности набора представлены в табл. 2, повторяемости и воспроизводимости – в табл. 3.

Таблица 3

Определение повторяемости и воспроизводимости амплификации стандартного образца в концентрации 10⁴ копий/мл

Мишень	Повторяемость, 16 повторов тестирования, среднее значение Ct (95%ДИ)		Воспроизводимость, 32 повторов тестирования, среднее значение Ct (95%ДИ)	
Вирус парагриппа 1-го типа	31,24	(30,51-31,97)	31,44	(31,01-31,87)
Вирус парагриппа 2-го типа	33,12	(32,78-33,46)	32,95	(32,78-33,13)
Вирус парагриппа 3-го типа	33,04	(32,95-33,14)	33,17	(33,08-33,26)
Вирус парагриппа 4-го типа	30,51	(30,39-30,62)	30,61	(30,52-30,69)
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	30,40	(30,19-30,60)	30,21	(30,06-30,36)
Риновирус	32,51	(32,30-32,71)	32,40	(32,28-32,53)
Коронавирус 229E	33,20	(33,11-33,28)	33,60	(33,44-33,76)
Коронавирус NL63	34,76	(34,62-35,08)	34,52	(34,42-34,63)
Коронавирус HKU1	32,30	(32,03-32,08)	32,43	(32,26-32,60)
Коронавирус OC43	33,71	(33,49-33,93)	33,85	(33,70-33,00)
Метапневмовирус	30,91	(30,75-31,06)	31,02	(30,90-31,13)
Аденовирус	31,09	(30,98-31,20)	31,14	(31,04-31,24)
Бокавирус	30,25	(30,12-30,38)	30,28	(30,19-30,38)

Таблица 4

Коэффициент каппа Коэна при тестировании двумя наборами

Возбудитель	Количество положительных образцов	% Совпавших результатов	Коэффициент каппа Коэна*
Вирусы парагриппа	21	96,36	0,81
Риновирус	17	95,13	0,57
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	15	96,94	0,78
Коронавирусы человека	32	92,65	0,72
Аденовирус	31	96,96	0,89
Метапневмовирус	30	95,67	0,84
Бокавирус	40	88,98	0,67

Примечание. * - Интерпретация значений коэффициента принята следующая [10]:

- 0,00 - Согласие отсутствует;
- <0,20 - Согласие почти отсутствует;
- 0,21 – 0,40 - Посредственное согласие;
- 0,41 – 0,60 - Умеренное согласие;
- 0,61 – 0,80 - Существенное согласие;
- 0,81 – 1,00 - Почти отличное согласие.

Сравнение с набором реагентов RespiFinder 2Smart. Было исследовано 162 образца из коллекции НИИ гриппа им. АА Смородинцева. Чаще всего выявлялся бокавирус (40 образцов, 24,7%), преимущественно в виде коинфекции с аденовирусом. Чуть реже обнаруживались коронавирусы (без типирования) и аденовирус (19,8 и 19,1% соответственно).

Для оценки согласия результатов выявления респираторных патогенов двумя наборами был рассчитан коэффициент каппа Коэна. Коэффициент Каппа Коэна (Cohen's kappa) позволяет оценивать согласие результатов двух классификаций для категориальных переменных [10]. Полученные данные представлены в табл. 4.

Обсуждение. В настоящее время молекулярные методы обнаружения патогенов человека и животных получили широкое распространение, и заменили многие диагностические методы, такие как культуры клеток и выявление антигенов. Особое значение молекулярные методы имеют для выявления возбудителей инфекций верхних и нижних дыхательных путей, поскольку позволяют одновременно выявлять значительное количество патогенов, дифференциальная диагностика которых по симптоматическим признакам затруднена.

Цель нашей работы заключалась в разработке и валидации набора реагентов для выявления 13-ти основных возбудителей острых респираторно-вирусных инфекций.

Аналитическая чувствительность набора позволяет оценивать минимальное количество возбудителя, который можно обнаружить в биологическом материале. В целом, хотя целесообразность определения единичных копий респираторных вирусов часто ставится под сомнение, вирусная нагрузка более 1000 копий/мл может быть ассоциирована с развитием симптомов и вероятностью осложнений, что было показано для риновируса [11, 12], вирусов парагриппы [13], респираторно-синцитиального вируса [14], метапневмовируса [15]. При этом, зависимости тяжести течения концентрации обнаружено не было. Чувствительность выявления вирусных патогенов разрабатываемым набором составила 500 копий/мл, за исключением коронавируса человека NL63, для которого минимальная выявляемая концентрация была 1000 копий/мл, что достаточно для выявления клинически значимых концентраций.

Аналитическая специфичность, в свою очередь, является показателем наличия перекрестных реакций с микроорганизмами и вирусами, присутствие которых можно ожидать в исследуемом биологическом материале, а также с ДНК человека. Эксперименты показали отсутствие перекрестной реакции с наиболее распространенными респираторными патогенами вирусной природы и бактериальной природы. Кроме того, внесение наиболее часто используемых лекарственных препаратов и интерферирующих веществ, которые могут попасть в биологический материал при его взятии, не оказало влияния на получаемый результат.

Важным этапом оценки работоспособности нового набора реагентов является его сравнение с реагентами других производителей. В данной работе в качестве набора сравнения использован набор реагентов RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды). Набор имеет европейский сертификат качества (CE, Conformité Européenne), широко применяется на территории Европы и мира. Набор имеет хорошие аналитические характеристики (16), однако отмечается, что чувствительность набора относительно риновируса, вирусов парагриппы 1 и 3-го типа, метапневмовируса и респираторно-синцитиального вируса была ниже, чем у наборов сравнения (моноплексных наборов и набора реагентов xTAG Respiratory Virus Panel Fast Assay производства Abbot Molecular, США) [17, 18].

Согласие результатов выявления патогенов двумя наборами различалась от возбудителя к возбудителю. Наибольшее согласие (то есть, совпадение большинства результатов) наблюдалось для аденовируса и метапневмовируса (коэффициент каппа Коэна больше

0,81). Наименьшее – для риновируса (коэффициент каппа Коэна 0,57, умеренное согласие). При этом дискордантные образцы были положительны в наборе АмплиПрайм и отрицательны в RespiFinder.

Не менее важной характеристикой теста является время проведения исследования. Наиболее затратным периодом при тестировании большого количества образцов оказывается этап экстракции, который можно сократить с использованием автоматических станций для экстракции. Затрачиваемое время на полный цикл анализа при использовании станции Hamilton составило 2,5 часа, из них 20 минут занимает этап экстракции, 2 часа – приготовление ПЦР-смеси и амплификация. Время анализа RespiFinder 2Smart составляет после этапа экстракции те же 2,5 часа, вместе с этапом выделения нуклеиновых кислот – 3 – 3,5 часа.

Выводы. В ходе проведенной работы был разработан и валидирован набор реагентов для молекулярной диагностики 13-ти основных возбудителей респираторных инфекций. Набор показал высокую чувствительность и специфичность в отношении выявления заявленных вирусов, хорошую сходимость результатов при сравнении с набором реагентов для выявления возбудителей ОРВИ RespiFinder 2Smart, а также короткое время, необходимое для проведения полного цикла анализа.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 3, 5, 6, 9, 11-18 см. REFERENCES)

- Халиуллина С.В., Анохин В.А., Демиденко К.Ю., Нягашкина Е.В., Халиуллина К.Р., Покровская Е.М., Хаертынов Х.С. Этимологические особенности современных острых респираторных вирусных инфекций у детей раннего возраста, госпитализированных в отделение интенсивной терапии. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018; 63(4): 101–7.
- Потапова Н.Л. Жизнеугрожающая бронхиальная астма у детей: от предикторов до прогноза. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2021; 66(2): 29–34.
- Хаитов Р.М., Моноциты, Р-лимфоциты и дендритные клетки при риновирус-индуцированном обострении бронхиальной астмы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18(1): 228–36.
- Ишмурзин Г.П., Серебрякова О.А., Сюев К.Н., Долганова Д.А., Гайнуллина А.Х. Осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы при респираторных вирусных инфекциях. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2022; 37(4): 31–7.
- Красько О.В. Статистический анализ данных в медицинских исследованиях: в 2 частях. Часть I. Минск: Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова; 2014.

REFERENCES

- <https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/b50/t4kqksh4b12a2iwwj-nha29922vu7naki5/GD-SEB.pdf>
- Khaliullina S.V., Anokhin V.A., Demidenko K.Yu., Nyagashkina E.V., Khaliullina K.R., Pokrovskaya E.M., Khaertynov Kh.S. Etymological peculiarities of modern acute respiratory viral infections in children of early age, hospitalized to the intensive care unit. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. 2018; 63(4): 101–7. (in Russian)
- Burk M., El-Kersh K., Saad M., Wiemken T., Ramirez J., Cavallazzi R. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. Rev.* 2016; 25(140):178–88.
- Potapova N.L. Life-threatening bronchial asthma in children: from predictors to prognosis. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. 2021; 66(2): 29–34. (in Russian)
- Hartert T.V., Wu P., Brunwasser S.M. Respiratory syncytial virus and asthma: untying the Gordian knot. *Lancet Respir. Med.* 2021; 9(10):1092–4.

6. Rudd P.A., Thomas B.J., Zaid A., MacDonald M., Kan-O K., Rolph M.S. et al. Role of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in asthma exacerbations: where are we now? *Clin. Sci. (London)*. 2017; 131(14):1713-21.
7. Khaitov R.M., Nikonova A.A., Khaitov M.R. Monocytes, B-cells and dendritic cells during rhinovirus-induced asthma exacerbation. *Byulleten` Sibirskoy meditsiny*. 2019; 18(1):228-36. (in Russian)
8. Ishmurzin G.P., Serebryakova O.A., Syuzev K.N., Dolganova D.A., Gainullina A.K. Cardiovascular complications of respiratory viral infections. *Sibirskiy zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny*. 2022; 37(4):31-7. (in Russian)
9. Arnold J.C., Singh K.K., Milder E., Spector S.A., Sawyer M.H., Gavali S., Glaser S. Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28(12):1057-60.
10. Kras'ko O.V. Statistical data analysis in medical studies: in 2 parts. [Statisticheskiy analiz dannykh v meditsinskikh issledovaniyakh. Chast' 2]. Minsk: Mezhdunarodnyi gosudarstvennyi ekologicheskiy institut imeni A.D. Sakharov; 2014. (in Russian)
11. Jacobs S.E., Lamson D.M., St. George K., Walsh T.J. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(1): 135-162.
12. Granados A., Goodall E.C., Luinstra K., Smieja M., Mahony J. Comparison of asymptomatic and symptomatic rhinovirus infections in university students: incidence, species diversity, and viral load. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(4):292-6.
13. Seo S., Xie H., Leisenring W.M., Kuypers J.M., Sahoo F.T., Goyal S. et al. Risk Factors for Parainfluenza Virus Lower Respiratory Tract Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019; 25(1):163-71.
14. Borg I., Rohde G., Löseke S., Bittscheidt J., Schultze-Werninghaus G., Stephan V., Bufe A. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *European Respiratory Journal*. 2003; 21: 944-51.
15. Oong X.Y., Chook J.B., Ng K.T., Chow W.Z., Chan K.G., Hanafi N.S. et al. The role of human Metapneumovirus genetic diversity and nasopharyngeal viral load on symptom severity in adults. *Virol. J.* 2018; 15:91.
16. Dabisch-Ruthe M., Vollmer T., Adams O., Knabbe C., Dreier J. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 12:163.
17. Liu G.S., Niu P.H., Zhao S.C., Lu R.J., Tan W.J. Detection of six common human paramyxoviruses in patients with acute febrile respiratory symptoms using a novel multiplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2019; 91(4):564-9.
18. Beckmann C., Hirsch H.H. Comparing Luminex NxTAG-Respiratory Pathogen Panel and RespiFinder-22 for multiplex detection of respiratory pathogens. *J. Med. Virol.* 2016; 88(8):1319-24.