

**Paulina Jaguś, Joanna Chorostowska-Wynimko, Adriana Roży**

Samodzielną Pracownią Diagnostyki Molekularnej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie  
Kierownik: dr hab. n. med. J. Chorostowska-Wynimko

## Diagnostyka wybranych zakażeń wirusowych układu oddechowego

### Diagnostics of selected respiratory virus infections

#### Abstract

Viral infections are the most common infectious diseases of the respiratory tract characterized by the considerable mortality (especially among children and elderly people) and considered as the significant economic burden. It has been demonstrated that implementation of rapid diagnostic methods enabled more appropriate treatment of respiratory viral infections, reduced mean hospitalization time and cost, as well as resulted in the significantly decreased mortality. Modern diagnostic methods effectively identify respiratory virus, its antigen or nucleic acids in biological samples by means of the immunological and molecular techniques. This article presents critical overview of those methods with particular emphasis on their clinical usefulness and clinical reliability.

**Key words:** virus, respiratory infection, diagnostics

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 1: 47–53**

#### Streszczenie

Infekcje wirusowe, najpowszechniej występujące choroby zakaźne układu oddechowego, są związane z istotną śmiertelnością, zwłaszcza wśród dzieci i osób starszych, a także znacznym obciążeniem ekonomicznym dla systemu opieki zdrowotnej. Doświadczenia ostatnich lat wskazują, że zastosowanie szybkich metod diagnostycznych potwierdzających wirusową etiologię infekcji ułatwia zastosowanie właściwego leczenia, pozwala skrócić czas i koszty hospitalizacji oraz skutkuje znaczącym spadkiem śmiertelności wśród tych chorych. Nowoczesne metody laboratoryjne wykorzystują zróżnicowane techniki immunologiczne i molekularne do wykazania w materiale biologicznym pobranym od chorego obecności wirusa, jego antygenów lub kwasu nukleinowego oraz ich identyfikacji. Praca stanowi krytyczny przegląd tych metod ze szczególnym uwzględnieniem ich przydatności i wiarygodności klinicznej.

**Słowa kluczowe:** wirus, zakażenie układu oddechowego, diagnostyka

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 1: 47–53**

#### Wstęp

Infekcje wirusowe, najpowszechniej występujące choroby zakaźne dróg oddechowych, są związane z istotną śmiertelnością zwłaszcza wśród dzieci i osób starszych. Wiąże się również ze znaczącym obciążeniem ekonomicznym systemu opieki zdrowotnej (dodatkowe porady lekarskie, koszty leczenia i hospitalizacji, absencje w pracy i szkole). Według badań amerykańskich, koszty spowo-

dowane samą grypą sięgają 76–167 mld dolarów w zależności od sezonu epidemicznego [1]. Niezwykle istotnym problemem zarówno z punktu widzenia społecznego, jak i medycznego jest powszechne nadużywanie antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń dolnych dróg oddechowych. Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych tylko 55% spośród 41 mln zleczonych antybiotyków jest stosowanych u pacjentów z bakteryjnymi zakażeniami dróg oddechowych [2]. Polska nie jest wyjąt-

**Adres do korespondencji:** mgr inż. Paulina Jaguś, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel.: (22) 431 21 05, faks: (22) 431 23 58, e-mail: myosotic@o2.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 05.09.2009 r.  
Copyright © 2010 Via Medica  
ISSN 0867–7077

kiem, zajmuje 10 miejsce w Europie pod względem całkowitego zużycia antybiotyków, a 13 miejsce pod względem zużycia dziennego na 1000 mieszkańców, wyprzedzając Niemcy, Wielką Brytanię i Hiszpanię — kraje o porównywalnej, a nawet większej populacji [3]. Należy podkreślić, że nadużywanie antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń dróg oddechowych wynika nie tylko ze złych nawyków, ale również z utrudnionego rozpoznania tych infekcji oraz relatywnie małej dostępności metod laboratoryjnych, potencjalnie umożliwiających szybkie wykrycie patogenu. Amerykańscy badacze wykazali, że wprowadzenie metod diagnostycznych pozwalających w realnie krótkim czasie (średnio 0,9 dnia) potwierdzić wirusową etiologię infekcji, nie tylko ułatwiło zastosowanie w odpowiednim czasie właściwego leczenia, ale również pozwoliło na skrócenie średniej długości hospitalizacji z 10,6 dni do 5,3 dni, obniżenie jej średniego kosztu z 7 893 dolarów/pacjenta do 2 177 dolarów, a także skutkowało znaczącym spadkiem śmiertelności z 18,2% do 7,4% [4].

W ostatnich latach dokonał się znaczący postęp w zakresie metod diagnostycznych, które mogą być skutecznie stosowane w realiach szpitalnych, również w Polsce, i pozwalają na szybkie, dostatecznie swoiste i czułe wykrywanie wirusów oddechowych. Omówiono je w niniejszej pracy ze szczególnym uwzględnieniem ich przydatności i wiarygodności klinicznej.

### **Warunki prawidłowego pobrania i transportu materiału biologicznego do badań**

Podstawowym warunkiem uzyskania wiarygodnego wyniku badań jest prawidłowe pobranie wysokiej jakości materiału biologicznego, jego natychmiastowy transport oraz odpowiednie przechowanie przed rozpoczęciem procedur laboratoryjnych. Optymalnie próbki powinny być pobrane przed rozpoczęciem leczenia i pochodzić z tkanek zmienionych chorobowo, zawierają wówczas największą liczbę cząstek/antygenów wirusowych. W diagnostyce infekcji górnych dróg oddechowych wykorzystuje się przede wszystkim: wymazy z nosa i gardła, aspiraty z nosogardzieli i popłuczyny z nosa, natomiast w zakażeniach dolnych dróg oddechowych uzasadnione może być dodatkowe pobranie aspiratów z tchawicy, płwociny, popłuczyn z drzewa oskrzelowego lub biopłatów płuc. Krew jest materiałem mało przydatnym, gdyż wiremia trwa w zakażeniach układu oddechowego stosunkowo krótko.

Do identyfikacji podstawowych wirusów oddechowych najczęściej wykorzystuje się materiał pobrany jałową wymazówką, zanurzaną następnie

w 1–1,5 ml roztworu jałowej soli fizjologicznej. Konieczne jest, by został on dostarczony do laboratorium natychmiast po pobraniu. Jedynym wyjątkiem od tej reguły są materiały do badań molekularnych, które mogą być przechowywane w temperaturze  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  przez 48 godzin od momentu ich pobrania. W każdej innej sytuacji, jeśli wykonanie analiz nie jest możliwe w ciągu 48–72 godzin, materiał powinien być zamrożony w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  [5, 6].

### **Metody diagnostyczne**

Diagnostyka laboratoryjna infekcji wirusowych opiera się na ocenie odpowiedzi immunologicznej organizmu na rozwijające się zakażenie (swoiste przeciwciała) lub też wykazaniu obecności wirusa, jego antygenów, ewentualnie kwasu nukleinowego w materiale klinicznym oraz ich identyfikacji.

### **Isolacja i identyfikacja wirusów w hodowlach komórkowych**

Isolacja wirusów w hodowlach komórkowych, a w przypadku wirusa grypy na zarodkach kurzych, jest tradycyjnie uważana za „złoty standard” diagnostyki wirusologicznej. Ma ona jednak ograniczone zastosowanie w praktyce klinicznej ze względu na małą dostępność i długi czas upływający od momentu pobrania materiału do uzyskania wyniku (3–14 dni). Należy też podkreślić, że niektóre wirusy, na przykład wirus zespołu ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS, *severe acute respiratory syndrome*), nie rozwijają się w kulturach komórkowych lub też jak w przypadku ludzkiego metapneumowirusa (hMPV, *human metapneumovirus*) ich identyfikacja jest trudna ze względu na wolne namnażanie wirusa, słaby efekt cytotacyjny oraz brak tworzenia syncytium. Te ograniczenia w oczywisty sposób obniżają przydatność metod hodowlanych w diagnostyce. Tymczasem metody molekularne umożliwiają znacznie szybsze otrzymanie co najmniej równie wiarygodnych wyników. W badaniu przeprowadzonym przez Ebihara i wsp. tylko w około 33% hodowli wskazano na hMPV jako czynnik etiologiczny, podczas gdy metodą łańcuchowej reakcji polimerazy wykorzystującą odwrotną transkrypcję (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction*) potwierdzono etiologię hMPV w 100% przypadków [7]. Paranhos-Baccala i wsp. w grupie 180 dzieci z zapaleniem oskrzelików potwierdzili etiologię zakażenia rinowirusami metodami molekularnymi u 21,2% pacjentów, natomiast tradycyjną hodowlą tylko u 2,2% [8].

Standardowe metody hodowlane stosowane są głównie w diagnostyce grypy (izolacja wirusa w zarodkach kurzych lub hodowli komórkowej). Wyróżnia je prawie 100-procentowa czułość, jednak wyniki są dostępne dopiero po około 3 dniach. Tymczasem zgodnie z zaleceniami celowana terapia powinna być rozpoczęta do 36 godzin od wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Klasyczne metody izolacji i namnażania wirusów grypy w hodowlach są natomiast wykorzystywane w procesie doboru szczepów szczepionkowych w każdym sezonie epidemicznym [1].

## Wykrywanie antygenów wirusowych

### Metody immunochromatograficzne

Szybkie testy pozwalające w ciągu 15–30 minut potwierdzić obecność antygenów wirusowych, głównie grypy i syncytialnego wirusa oddechowego (RSV, *respiratory syncytial virus*) są oparte na metodzie immunochromatograficznej (IC). Łatwe do wykonania, znajdują praktyczne zastosowanie zwłaszcza w podstawowej opiece zdrowotnej, gabinetach lekarzy rodzinnych [9].

Ghebremedhin i wsp. ocenili wartość diagnostyczną szybkiego testu immunologicznego wykrywającego antygeny wirusa grypy typu A i B w materiałach biologicznych pobranych z układu oddechowego. Preferowanymi materiałami używanymi w teście były aspiraty z nosa, popłuczyny nosowe oraz wymazy z nosa. Czułość i specyficzność testu dla obu wirusów wynosiły odpowiednio 65% i 100% [10]. Równie wysoka jest czułość i swoistość testów immunochromatograficznych służących do detekcji RSV, która wynosi odpowiednio 90% i 94–100% [11]. Szybkie testy paskowe są też z powodzeniem stosowane w diagnostyce zapalenia górnych i dolnych dróg oddechowych wywołanych przez adenowirusy. Cechuje je co prawda wysoka swoistość (91–100%), jednak czułość jest relatywnie niska (54,5–95%) [12].

Wprawdzie za najbardziej czułą i specyficzną metodę detekcji wirusa hMPV uznawany jest RT-PCR [7, 13], wymaga jednak zastosowania specjalistycznego sprzętu, a wynik otrzymywany jest po około 6 godzinach. Kikuta i wsp. badali skuteczność detekcji hMPV w wydzielinie z nosogardła za pomocą analizy IC, wykorzystując *real-time* RT-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym) jako metodę referencyjną. Wykazali, że metoda IC w 70,6% badanych próbek potwierdziła dodatni wynik badania PCR, czułość wzrastała do 79,6% jeśli wydzielinę pobrano w ciągu 1–4 dni od wystąpienia objawów infekcji [14].

Należy podkreślić, że paskowe testy immunochromatograficzne cechują się co prawda mniejszą wiarygodnością diagnostyczną niż RT-PCR (czułość), są jednak łatwiejsze w wykonaniu, nie wymagają korzystania z aparatury i wykwalifikowanego personelu, a wyniki można uzyskać już po 15 minutach. Dodatkowo szacuje się, że koszty pojedynczego testu IC są około 10 razy niższe niż w przypadku RT-PCR [14].

### Metody immunoenzymatyczne

Do szybkiej detekcji antygenów wirusowych (15–30 min) w laboratoriach diagnostycznych, mogą być też stosowane łatwe do przeprowadzenia analizy immunoenzymatyczne (IE). Podobnie jak testy paskowe, metoda IE jest najczęściej wykorzystywana w diagnostyce wirusów grypy A i B oraz RSV [9]. Wyniki licznych badań porównujących metody immunoenzymatyczne z klasyczną izolacją wirusów w hodowlach komórkowych wykazały, że czułość IE jest bardzo zróżnicowana i może wahać się w przedziale 44–95% w diagnostyce wirusów grypy oraz 59–89% przy wykrywaniu RSV [15]. Wykazano też, że w okresie wzmożonego występowania infekcji dróg oddechowych (grudzień–marzec), czułość testu IE dla RSV wzrasta do 93–100%, a dla wirusów grypy do 74–100% [5, 15]. Zjawisko to tłumaczy się typowym dla sezonu jesienno-wiosennego spadkiem odporności pacjentów, co z kolei sprzyja szybszemu namnażaniu wirusa oraz dłuższemu utrzymywaniu się jego cząstek w organizmach chorych.

Na rynku polskim dostępne są testy IE umożliwiające jednoczesną detekcję i różnicowanie wirusów grypy A i B. Na podstawie analizy aspiratów nosowo-gardłowych pobranych od pacjentów w różnym wieku określono, że dla obu wirusów swoistość testu wynosi 100%, natomiast średnia czułość dla wirusów A i B odpowiednio 82,9% oraz 51,5% [16].

Należy podkreślić, że wyniki szybkich testów przyłóżkowych zarówno IC, jak i IE powinny być zweryfikowane innymi bardziej czułymi metodami diagnostycznymi (IF, RT-PCR). Testy IC oraz IE są zwykle przeznaczone do stosowania w ostrej fazie infekcji, kiedy liczba cząstek wirusowych jest nie mniejsza niż  $10^5$ – $10^6$ . Tak więc próbki biologiczne pobrane zbyt późno, w okresie zdrowienia lub też pobrane i przechowywane nieprawidłowo (mrożenie materiału może prowadzić do degradacji antygenów i w rezultacie obniżyć czułość testów) mogą zawierać stężenie antygeny poniżej progu wykrywalności. Wszelkie wątpliwości co do wiarygodności wyniku, szczególnie jeśli jest on niezgodny z objawami klinicznymi, powinny być rozstrzygane testem referencyjnym RT-PCR lub IF. Podkreślenia wymaga też fakt, że wykrycie anty-

genów wirusowych nie wyklucza udziału innych patogenów w rozwoju zakażenia [9].

### Metody immunofluorescencji

Testy immunofluorescencyjne należą do najczęściej używanych metod detekcji antygenów wirusowych w laboratoriach diagnostycznych, są też stosowane jako metoda potwierdzająca wyniki uzyskane w teście IE lub IC, szczególnie jeśli występuje podejrzenie infekcji wywołanej przez więcej niż jeden typ wirusa [9]. Zaletą metody IF jest też jej szybkość — wynik uzyskiwany jest w ciągu 30–90 minut. Na podstawie badań porównujących IF z metodą izolacji wirusów w hodowlach wykazano, że czułość IF wynosi przeciętnie około 81% i jest najwyższa dla wirusa RS (84–99%), natomiast najniższa dla adenowirusów (0–58%) [15].

W szybkiej diagnostyce zakażeń wirusami oddechowymi stosuje się gotowe testy IF wykrywające tak zwany zespół 7 wirusów oddechowych, a więc: wirusa grypy typu A i B, paragrypy typu 1–3, adenowirusy i wirusa RS. Stosuje się również testy umożliwiające identyfikację poszczególnych wirusów w materiale biologicznym. Metody IF są szczególnie użyteczne w detekcji wirusów oddechowych u dzieci, u których czas utrzymywania się wysokiego stężenia cząstek wirusowych w wydzielinie dróg oddechowych jest znacznie dłuższy niż u dorosłych. Należy przypomnieć, że najlepszą jakość badania zapewnia użycie świeżo pobranego materiału biologicznego, przechowywanego w niskiej temperaturze do czasu wykonania testu [9].

Aslanzadeh i wsp. [17] wykazali przydatność metod IC i IF do szybkiej detekcji antygenów wirusa RSV oraz hMPV w odniesieniu do metody referencyjnej RT-PCR, przeanalizowali wydzielinę z nosogardła pobraną od 515 pacjentów. Czułość i swoistość testów wykrywających antygen RSV wynosiły odpowiednio; IC: 79,8% i 89,5% oraz IF: 94,1% i 96,8%, natomiast detekcji antygeny hMPV IF(I): 62,5% i 99,8% oraz IF(II): 63,2% i 100%. Ta analiza dowodzi, że wprawdzie metoda IC pozwala na szybkie uzyskanie wyników (30–60 min) i ich łatwą ocenę, jednak jej czułość jest niedostateczna w przypadku detekcji RSV. Z kolei metody immunofluorescencyjne charakteryzuje większa czułość i swoistość, jednak interpretacja wyników wymaga doświadczenia, jest subiektywna i bardziej czasochłonna (30–105 min).

### Detekcja kwasów nukleinowych w materiale klinicznym

Coraz większą rolę w diagnostyce wirusów oddechowych odgrywają metody wykorzystujące amplifikację kwasów nukleinowych (NAT, *nucleic acid technology*). Charakteryzuje je znacznie

wyższa czułość i swoistość niż pozostałe techniki oraz mniej restrykcyjne wymagania w stosunku do badanego materiału biologicznego (konieczne minimum to tylko 2–5 cząstek wirusowego RNA lub DNA). Amplifikacja kwasów nukleinowych umożliwia także wczesne wykrycie materiału genetycznego wirusa, już w dniu wystąpienia objawów, zanim liczba antygenów osiągnie poziom detekcji wymagany przez inne metody. Warto również podkreślić, że aktualnie dostępne testy diagnostyczne wykorzystujące metodę immunofluorescencji czy też immunochromatografii przeznaczone są do wykrywania najczęstszych patogenów, zwykle wirusów grypy A i B, RSV i para grypy. Natomiast pula wirusów, które można identyfikować za pomocą metod molekularnych, włączając w to niedawno poznane wirusy (SARS-Co, hMPV, coronawirusy NL63 i HKU1) stale rośnie [18]. Metody NAT najczęściej używane do detekcji wirusów oddechowych to RT-PCR, *real-time* RT-PCR lub metoda oznaczania ilości transkryptu na podstawie sekwencji kwasu nukleinowego (NASBA, *nucleic acid sequence-based amplification*). Istnieje wiele dowodów na znacząco wyższą czułość metody RT-PCR niż izolacji wirusów z kultur komórkowych, czy immunofluorescencji. Reis i wsp. przebadali 316 aspiratów nosowych pobranych od dzieci, wykorzystując do potwierdzenia obecności RSV metody izolacji w hodowlach komórkowych, test IF oraz RT-PCR. Na 36 materiałów pozytywnych (11,4% z 316), test RT-PCR był dodatni w 35 (11,1%) przypadkach, IF w 25 (7,9%), natomiast metoda izolacji wirusa w 20 (6,3%). Istotne znaczenie ma fakt, że test RT-PCR odznaczał się także większą specyficznością względem rozpoznawanego wirusa, gdyż nie stwierdził obecności wirusa w 11 próbach, w których metodą IF uzyskano wynik pozytywny [19].

Tradycyjne metody PCR są coraz częściej wypierane przez *real-time* PCR, wykorzystujący techniki fluorescencyjne, co umożliwia monitorowanie ilości produktu reakcji w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR. Jest on preferowany ze względu na znaczną automatyzację techniki, mały udział człowieka oraz mniejszą czasochłonność. Jednak podstawową zaletą tej metody jest jej ilościowy charakter, w przeciwieństwie do klasycznej metody PCR zapewniającej jedynie wynik jakościowy (plus/minus). Znakowane sondy łączące się z replikowanym DNA wirusa umożliwiają pomiar liczby jego cząsteczek w materiałach klinicznych. Metoda *real-time* PCR umożliwia więc określenie wyjściowego poziomu wirusii, może też służyć do monitorowania postępów leczenia u pacjentów. Podstawową wadą tej metody diagnostycznej jest jej koszt. Część autorów podkreśla, że jedynie w przy-

padku istotnego skrócenia czasu badania (< 24 godz.), korzyść uzyskana z szybkiego potwierdzenia wirusowej etiologii zakażenia, rezygnacji ze stosowania antybiotyków i włączenia właściwej terapii mogą z ekonomicznego punktu widzenia uzasadniać rutynowe stosowanie tak drogich badań diagnostycznych [20]. Oosterheert i wsp. wykazali, że metoda *real-time* PCR znacząco zwiększyła liczbę rozpoznanych infekcji wirusowych, jednak zbyt długi okres oczekiwania na wynik (ok. 48 godz.) spowodował, że z antybiotykoterapii zrezygnowano tylko u 11% pacjentów. W efekcie zastosowanie drogiego badania diagnostycznego nie obniżyło istotnie kosztów leczenia i zużycia antybiotyków [21].

Oprócz wysokiej swoistości i specyficzności względem rozpoznawanego wirusa, diagnostyka wirusów oddechowych powinna mieć charakter kompleksowy ze względu na szerokie spektrum potencjalnych patogenów wywołujących te same albo podobne objawy kliniczne. Glezen i wsp. potwierdzili ko-infekcję wirusami RS, paragrypy, *rhino* i *corona* u ponad 10% pacjentów z ostrym zapaleniem dróg oddechowych. Podkreśla się też, że jednoczesne wykrycie wielu patogenów umożliwia dokładniejsze scharakteryzowanie przyczyn zakażenia, powstrzymanie jego rozprzestrzeniania oraz zoptymalizowanie stosowanej terapii [22]. Szerokie wykorzystanie NAT w diagnostyce wirusów oddechowych jest też ograniczane przez stosunkowo wysoki koszt badania w kierunku pojedynczego typu wirusa. Znaczące obniżenie kosztów diagnostyki zapewniają testy umożliwiające jednoczesną detekcję wielu wirusów podczas jednej reakcji PCR. Brittain-Long i wsp. opracowali test oparty na metodzie *multiplex real-time* PCR, za pomocą którego możliwa jest jednoczesna diagnostyka wirusa grypy A i B, para grypy 1–3, hMPV, RSV, rhinowirusa, enterowirusa, adenowirusa, koronawirusów (229E, OC43, NL63) oraz bakterii atypowych *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* w wydzielinie z nosogardła. Po przebadaniu tym testem 954 pacjentów z aktywną infekcją dróg oddechowych stwierdzono obecność wirusa grypy A w 25% próbach, RSV w 20%, a hMPV i *M. pneumoniae* w 10%. Według szacunków autorów koszt badania pojedynczego pacjenta był znacząco niższy w porównaniu ze standardowymi metodami wykrywającymi pojedyncze patogeny i wynosił około 33 euro [23]. Badania porównujące multipleksowe reakcje PCR, czy też *real-time* PCR z zastosowaniem licznych primerów do klasycznej metody izolacji wirusa w hodowlach komórkowych potwierdzają ich wysoką skuteczność i wiarygodność. Metoda multipleksowa *RespiFinder* umożliwiającą wykrycie 15 wirusów pod-

czas jednej reakcji charakteryzowała się 95-procentową czułością. Dla RSV wynosiła ona około 80% (próba 141 osób) [24].

Potencjał diagnostyczny multipleksowej detekcji wirusów można dodatkowo poszerzyć, używając nowych technik wykorzystujących mikromacierze oraz mikrokulki (*bead detection formats*). Najbardziej czuła i specyficzna wydaje się być multipleksowa amplifikacja kwasów nukleinowych uzupełniona ich analizą za pomocą mikromacierzy. W badaniach porównawczych czułość tej metody, która umożliwia równoczesną identyfikację 20 wirusów, była weryfikowana izolacją wirusów w hodowlach i wynosiła 98,4% (potwierdzono 180 ze 183 próbek pozytywnych), podczas gdy dla IF w tym samym materiale 68,8% (126 ze 186 materiałów pozytywnych) [25].

### Testy serologiczne

Testy serologiczne mają ograniczone zastosowanie w diagnostyce, zwłaszcza szybkiej, wirusowych infekcji układu oddechowego. Istotne znaczenie uzasadniające racjonalny wybór tej metody ma czas, jaki upłynął od wystąpienia pierwszych objawów choroby. W miarę trwania choroby na skutek działania mechanizmów immunologicznych spada liczba cząstek wirusa dostępnych w materiale klinicznym i maleje przydatność testów opartych na identyfikacji antygenów. W niektórych sytuacjach klinicznych (np. infekcja wirusem grypy) detekcja wirusa, jego antygenów lub materiału genetycznego jest możliwa jedynie w ciągu pierwszych 5 dni od wystąpienia objawów. Później diagnostyka powinna opierać się właśnie na testach serologicznych. Podstawą rozpoznania jest stwierdzenie obecności przeciwciał klasy IgM, jednak nie wcześniej niż po 8–10 dniach od wystąpienia pierwszych objawów choroby, lub też potwierdzenie serokonwersji — wykazanie co najmniej 4-krotnego przyrostu miana przeciwciał klasy IgG i/lub IgM w dwóch kolejnych próbach krwi pobranych w okresie ostrym, a następnie po 7–10 dniach w okresie rekonwalescencji [26].

Najczęściej wykorzystywanymi badaniami serologicznymi w diagnostyce zakażeń wirusowych są: test zahamowania hemaglutynacji (OZHA), test zahamowania neuraminidazy (NI) oraz odczyn immunoenzymatyczny, za pomocą których można określić klasy immunoglobulin.

W praktyce najczęściej oznaczane jest stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko wirusom grypy A, B (czułość 44–74%) oraz RSV (czułość 59–93%) [26]. Badania te wykonuje się z reguły dla celów epidemiologicznych, ewentualnie diagnostycznych w razie problemów z pozyskaniem wła-

ściwej wydzieliny z dróg oddechowych. We wczesnym stadium infekcji spowodowanej wirusem grypy przeciwciała klasy IgM pojawiają się u 36% pacjentów, a po około 2 tygodniach od zachorowania występują u 86% zakażonych. W przypadku reinfekcji RSV wysokie miana przeciwciał klasy IgG wykrywane są w surowicy już po 5–7 dniach. Należy zaznaczyć, że u niemowląt poniżej 6. miesiąca życia obserwuje się niskie stężenia przeciwciał klasy IgM i IgG w odpowiedzi na pierwotne zakażenie RSV [27]. Najpóźniej rozwija się odpowiedź przeciwwirusowa w postaci surowicznych i sekrecyjnych przeciwciał klasy IgA; jest ona również słaba u dzieci w pierwszym półroczu życia. W czasie zakażenia wirusem RS w wydzielinie z jamy nosowej stwierdza się też wolne i związane specyficzne przeciwciała klasy IgE [28].

Zastosowanie diagnostyki serologicznej w przebiegu innych ostrych infekcji wirusowych dróg oddechowych jest ograniczone. Na przykład w przebiegu zakażenia wirusem parainfluenzy przeciwciała klasy IgM wykrywane są jedynie u około połowy pacjentów. Co więcej, ze względu na ściśle podobieństwo serotypów paragrypy (w szczególności serotypów 1 i 3) ich różnicowanie przy wykorzystaniu technik serologicznych jest bardzo trudne. W surowicy dzieci, u których stwierdzono wysokie miano przeciwciał przeciwko serotypowi 1, w większości przypadków miano przeciwciał przeciwko wirusowi typu 3 było na podobnym poziomie [29]. Dodatkowo nieswoiste

reakcje krzyżowe mogą występować między serotypami paragrypy 1 i 3 a wirusem świnki [30–33].

Omawiając przydatność kliniczną metod serologicznych w diagnostyce zakażeń o etiologii wirusowej, warto przypomnieć ich niską wiarygodność u małych dzieci (luka odpornościowa) i pacjentów z niedoborami immunologicznymi. U dzieci istotne zwiększenie stężenia immunoglobulin następuje od drugiego półrocza życia i dopiero w wieku 15 lat osiąga wartości zbliżoną do stężenia tych przeciwciał u dorosłych. Uważa się, że pełną zdolność do produkcji IgM dziecko osiąga około 12. miesiąca życia, IgG najprawdopodobniej w wieku szkolnym, a IgA około 12. roku życia. Dodatkowo dla tej grupy wiekowej charakterystyczne są znaczne wahania poziomu immunoglobulin, nieobserwowane u dorosłych. Mogą być one zależne między innymi od pory roku (jesienią stężenie IgM może być 7-krotnie wyższe niż wiosną) [34].

Należy również pamiętać, że w przypadku zakażeń nawrotowych (szczególnie często występujących u dzieci i osób z niedoborami immunologicznymi) znamienny przyrost miana przeciwciał może być trudny do uchwycenia.

Wadą metod serologicznych, szczególnie istotną dla lekarzy pediatrów, jest konieczność pobrania krwi, kłopotliwej procedury u dzieci. Alternatywnym i nieinwazyjnym rozwiązaniem wydaje się oznaczanie stężenia przeciwciał w ślinie. Okiro i wsp. za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA weryfikowali przydatność ba-

**Tabela 1. Najczęstsze wirusy wywołujące zakażenia dróg oddechowych i metody diagnostyczne służące do ich detekcji**

**Table 1. The most common viruses causing respiratory tract infections and diagnostic methods for their detection**

Rodzina	Wirus	Diagnostyka
<i>Orthomyxoviridae</i>	Grypa A, B, C	Izolacja wirusa w hodowlach komórkowych lub na zarodkach kurzych; wykrywanie antygenu: IC, IF, ELISA, RT-PCR; metody serologiczne: odczyn neutralizacji OZHA, OWD, ELISA
<i>Paramyxoviridae</i>	Paragrypa 1–4	Izolacja wirusa w hodowlach komórkowych; wykrywanie antygenu: IF, ELISA, RT-PCR; metody serologiczne: OWD, ELISA, OZHA
	RSV	Izolacja wirusa w hodowlach komórkowych; wykrywanie antygenu: IC, IF, ELISA, RT-PCR
	Metapneumowirus ludzki	Wykrywanie antygenu: IC, RT-PCR
<i>Adenoviridae</i>	Adenowirusy	Izolacja wirusa w hodowlach komórkowych; wykrywanie antygenu: IF, IC, RT-PCR
<i>Picornaviridae</i>	Rhinowirusy enterowirusy (Coxsackie A i B, wirusy Echo, enterowirus 68)	Izolacja wirusa w hodowlach komórkowych; wykrywanie antygenu: testy ELISA, RT-PCR, metody serologiczne — test neutralizacji
<i>Coronaviridae</i>	Koronawirusy (HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS CoV)	Metody serologiczne; wykrywanie antygenu: RT-PCR
<i>Parvoviridae</i>	Bocawirus	RT-PCR

OZHA — odczyn zahamowania hemaglutynacji; OWD — odczyn wiązania dopelniacza; IF — metoda immunofluorescencji; IC — metoda immunochromatograficzna; RSV (*respiratory syncytial virus*) — syncytialny wirus oddechowy; RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) — łańcuchowa reakcja polimerazy wykorzystująca odwrotną transkrypcję; SARS (*severe acute respiratory syndrome*) — wirus zespołu ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej

dania w ślinie dzieci poziomu przeciwciał IgG i IgA specyficznych względem RSV. Autorzy potwierdzili istotny wzrost stężenia przeciwciał IgG podczas infekcji wirusem RS, jak również istotną korelację między stężeniem przeciwciał w surowicy i ślinie (tab. 1) [35].

### Podsumowanie

Postęp, jaki dokonał się w ostatnich latach w diagnostyce zakażeń umożliwia stosowanie, często równocześnie, wielu metod w celu efektywnej detekcji wirusów oddechowych. Wybór odpowiednich testów jest uzależniony od rodzaju wykrywanego wirusa, przypuszczalnej ilości antygenów, badanej populacji pacjentów oraz możliwości technicznych i doświadczenia jednostki badawczej. Należy podkreślić, że faktyczną wartość kliniczną mają przede wszystkim testy identyfikujące wirus w czasie nie dłuższym niż 24 godziny.

Jedną z najczęściej stosowanych metod diagnostyki zakażeń wirusowych dróg oddechowych jest immunofluorescencja, głównie ze względu na krótki czas i relatywnie prostą metodykę oznaczeń. Jednak w niedalekiej przyszłości standardem diagnostycznym staną się testy molekularne, wykorzystujące amplifikację kwasów nukleinowych, nie tylko z powodu najwyższej czułości i swoistości, ale również ze względu na możliwość wykonania równoczesnych badań w kierunku wielu patogenów w tej samej próbce materiału biologicznego.

### Piśmiennictwo

- Brydak B.B. Nadzór, diagnostyka, terapia i profilaktyka w wirusowych zakażeniach dróg oddechowych. *Przew. Lek.* 2008; 1: 148–153.
- Gonzales R., Malone D.C., Maselli J.H., Sande M.A. Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 757–762.
- European Surveillance of Antimicrobial Consumption 2006 yearbook. [http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=\\*ESAC2&n=50036;1.10.2009](http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50036;1.10.2009).
- Barenfanger J., Drake C., Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 37: 1415–1418.
- WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis 2005: WHO report 2005, Geneva, Switzerland. [www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/rapidtestinfluenza\\_web.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapidtestinfluenza_web.pdf); 1.10.2009.
- Halonen P., Herholzer J., Ziegler T. Advances in the diagnosis of respiratory virus infections. *Clin. Diagn. Virol.* 1996; 5: 91–100.
- Ebihara T., Endo R., Kikuta H., Ishiguro N., Ishiko H., Hara M., Takahashi Y., Kobayashi K. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 126–132.
- Paranhos-Baccalà G., Komurian-Pradel F., Richard N., Vernet G., Lina B., Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J. Clin. Virol.* 2008; 43: 407–410.
- Ginocchio C.C. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J. Clin. Virol.* 2007; 40 (supl. 1): S11–S14.
- Ghebremedhin B., Engelmann I., König W., König B. Comparison of the performance of the rapid antigen detection *actim* Influenza A&B test and RT-PCR in different respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 58: 365–370.
- Selvarangan R., Abel D., Hamilton M. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62: 157–161.
- Levent F., Jewel M., Greer J.M., Snider M., Demmler-Harrison G.J. Performance of a new immunochromatographic assay for detection of adenoviruses in children. *J. Clin. Virol.* 2009; 44: 173–175.
- van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R.A. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Osterhaus AD. Nat. Med.* 2001; 7: 719–724.
- Kikuta H., Sakata C., Gamo R. i wsp. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time reverse transcription-PCR for detection of human metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 928–932.
- Leland D.S., Ginocchio C.C. 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20: 49–78.
- Reina J., Padilla E., Alonso F., Ruiz De Gopegui E., Munar M., Mari M. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza A and B virus antigens from respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 3515–3517.
- Aslanzadeh J., Zheng X., Li H., Tetreault J. i wsp. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 1682–1685.
- Fox J.D. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Virol.* 2007; 40 (supl. 1): S15–23.
- Reis A.D., Fink M.C., Machado C.M. i wsp.; CHIADO and RDGV/FAPESP Research Groups. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2008; 50: 37–40.
- Murdock D.R. Impact of rapid microbiological testing on the management of lower respiratory tract infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 1445–1447.
- Oosterheert J.J., van Loon A.M., Schuurman R. i wsp. Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for directed antiviral treatment using R-Mix cultures. *J. Clin. Virol.* 2002; 24: 107–115.
- Glezen W.P., Greenberg S.B., Atmar R.L., Piedra P.A., Couch R.B. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. *J. Am. Med. Assoc.* 2000; 283: 499–505.
- Brittain-Long R., Nord S., Olofsson S., Westin J., Anderson L.M., Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J. Clin. Virol.* 2008; 41: 53–56.
- Reijans M., Dingemans G., Klaassen C.H. i wsp. RespiFinder: a New Multiparameter Test To Differentially Identify Fifteen Respiratory Viruses. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 1232–1240.
- Krunić N., Yager T.D., Himsforth D., Merante F., Yaghoobian S., Janeczko R. xTAG RVP assay: analytical and clinical performance. *J. Clin. Virol.* 2007; 40 (supl. 1): S39–46.
- Chorostowska-Wynimko J. Diagnostyka immunologiczna i serologiczna chorób płuc. W: Antczak A., Pruszczyk P., Myśliwiec M. (red.) Wielka Interna. Medical Tribune Polska (w druku).
- Carlsen K.H., Mellbye O.J., Fuglerud P. i wsp. Serum immunoglobulin G subclasses and serum immunoglobulin A in acute bronchiolitis in infants. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1993; 4: 20–25.
- Szczawińska-Popłonyk A. Immunopatologia zakażenia wirusem RS. *Nowa Pediatria.* 2005; 1: 6–11.
- Henrickson K.J. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 242–264.
- Frankova V., Holubova J., Grubhoffer L., Kasova U. Contribution to laboratory diagnosis of mumps and parainfluenza. *Acta Virol.* 1988; 32: 503–514.
- Julkunen, I. Serological diagnosis of parainfluenza virus infections by enzyme immunoassay with special emphasis on purity of viral antigens. *J. Med. Virol.* 1984; 14: 177–187.
- Lennette E.H., Jensen F.W., Guenther R.W., Magoffin R.L. Serologic responses to parainfluenza viruses in patients with mumps virus infection. *J. Lab. Clin. Med.* 1963; 61: 780–788.
- Vuorinen T., Meurman O. Enzyme immunoassays for detection of IgG and IgM antibodies to parainfluenza types 1, 2, and 3. *J. Virol. Methods* 1989; 23: 63–70.
- Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler G.J., Kaplan S.L. Textbook of pediatric infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders 2004; 3297–3318.
- Okiro E.A., Sande C., Mutunga M., Medley G.F., Cane P.A., Nokes D.J. Identifying infections with respiratory syncytial virus by using specific immunoglobulin G (IgG) and IgA enzyme-linked immunosorbent assays with oral-fluid samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 1659–1662.