

УДК [616.98:578]-078

Лабораторная диагностика вирусных инфекций

Н.Н. Носик, В.М. Стаханова

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

Laboratory Diagnosis of Viral Infections

N.N. Nosik, V.M. Stachanova

Введение

Расширение возможностей в лечении и профилактике вирусных болезней с использованием противовирусных препаратов, иммуномодуляторов и вакцин с различным механизмом действия нуждается в быстрой и точной лабораторной диагностике. Узкая специфичность некоторых противовирусных препаратов также требует быстрой и высокоспецифичной диагностики инфицирующего агента. Появилась необходимость в количественных методах определения вирусов для мониторинга противовирусной терапии. Помимо установления этиологии заболевания лабораторная диагностика имеет важное значение в организации противоэпидемических мероприятий.

Ранняя диагностика первых случаев эпидемических инфекций позволяет своевременно провести противоэпидемические мероприятия – карантин, госпитализацию, вакцинацию и пр. Реализация программ по ликвидации инфекционных заболеваний, например натуральной оспы, показала, что по мере их выполнения возрастает роль лабораторной диагностики. Существенную роль играет лабораторная диагностика в службе крови и акушерской практике, например, выявление доноров, инфицированных *вирусом иммунодефицита человека* (ВИЧ), вирусом гепатита В (HBV), диагностика краснухи и цитомегаловирусной инфекции у беременных.

Диагностические методы

В лабораторной диагностике вирусных инфекций имеются три основных подхода (табл. 1, 2):

Контактный адрес:

Н.Н. Носик

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, РАМН

Тел.: (095) 190-28-43; факс: (095) 190-28-67

Эл. почта: nossik2@glasnet.ru

1) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;

2) изоляция и идентификация вируса из клинического материала;

3) серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител в течение болезни.

При любом выбранном подходе к вирусной диагностике одним из важнейших факторов является качество исследуемого материала. Так, например, для прямого анализа образца или для изоляции вируса исследуемый материал должен быть получен в самом начале заболевания, когда возбудитель еще экскретируется в относительно больших количествах и не связан пока антителами, а объем образца должен быть достаточен для проведения прямого исследования. Также важен выбор материала в соответствии с предполагаемым заболеванием, то есть того материала, в котором исходя из патогенеза инфекции вероятность присутствия вируса наибольшая.

Не последнюю роль в успешной диагностике играет среда, в какую берется материал, как он транспортируется и как хранится. Так, носоглоточные или ректальные мазки, содержимое везикул помещают в среду, содержащую белок, предотвращающий быструю потерю инфекционности вируса (если планируется его изоляция), или в соответствующий буфер (если планируется работа с нуклеиновыми кислотами).

Прямые методы диагностики клинического материала

Прямые методы – это методы, которые позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную *нуклеиновую кислоту* (НК) непосредственно в клиническом материале, то есть являются наи-

Таблица 1. Методы диагностики вирусных инфекций* [10]

Наименование вирусов	Применимость методов					Комментарии
	Культура клеток	Непосредственная детекция вируса или его антигенов			Серологические методы	
		Иммунологические методы (ИФА, РИА)	Микроскопия	Молекулярные методы		
1	2	3	4	5	6	7
Аденовирусы	А	А	Б	В	Б	Культура клеток наиболее информативна для респираторных образцов; ИФА наиболее часто используется при исследовании фекалий; электронная микроскопия используется в соответствующим образом оснащенных лабораториях для исследования фекалий
Арбовирусы	В	Г	В	Б	А	Следует использовать меры предосторожности как при работе с микроорганизмами I-II групп патогенности; электронная микроскопия используется в соответствующим образом оснащенных лабораториях для исследования образцов тканей; серологические методы наиболее широко используются для диагностики и эпидемиологических исследований
Калицивирусы и родственные им вирусы	В	Б	А	Б	В	Культура клеток применима только для астровирусов; иммунологические методы потенциально применимы, но требуют необходимых реактивов; электронная микроскопия используется в соответствующим образом оснащенных лабораториях
Цитомегаловирусы	А	Г	Б	Б	А	Однослойная микрокультура клеток (<i>shell vial</i>) может быть использована для быстрой детекции репликации вируса; определение IgM антител - для диагностики первичной инфекции, особенно у новорожденных, IgG антител - для установления восприимчивости к инфекции
Энтеровирусы	А	Г	Г	А	В	Для некоторых штаммов обычные культуры клеток не могут быть использованы; ПЦР является методом выбора для диагностики инфекций центральной нервной системы (ЦНС)
Вирус Эпштейна-Барра	Г	Г	Б	Б	А	<i>In situ</i> методы применимы для диагностики вирус-ассоциированных опухолей; ПЦР может быть использована для диагностики инфекций ЦНС; обычно диагноз устанавливается серологически
Фило- и аренавирусы	Б	В	Б	Б	А	Следует использовать меры предосторожности как при работе с особо опасными инфекциями; электронная микроскопия используется в соответствующим образом оснащенных лабораториях
Вирус гепатита А	В	Б	В	Б	А	Определение IgG и IgM антител наиболее приемлемо в качестве первичного диагностического теста
Вирус гепатита В	Г	А	Б	Б	А	Детекция специфических вирусных антигенов и антител к ним используется для диагностики и мониторинга инфекции
Вирусы гепатитов С и G	Г	Б	Г	Б	А	Серологические методы наиболее широко используются для диагностики и эпидемиологических исследований; молекулярные методы могут быть использованы при наличии соответствующих материалов и оборудования

1	2	3	4	5	6	7
Вирус гепатита D	Г	В	В	В	Б	Диагноз - только при наличии инфекции вирусом гепатита В; исследование биоптата печени может быть необходимо для подтверждения диагноза
Вирус гепатита E	Г	В	Б	В	А	Электронная микроскопия может использоваться в соответствующим образом оснащенных лабораториях; наиболее часто используется серологическая диагностика (обычно в централизованных лабораториях)
Вирус простого герпеса	А	Б	А	Б	Б	Однослойная микрокультура клеток (<i>shell vial</i>) может быть использована для быстрой детекции репликации вируса; иммунофлюоресцентная микроскопия используется для детекции вирусных антигенов в кожных элементах; ПЦР является методом выбора для диагностики инфекции ЦНС; серологические методы обычно используются для установления восприимчивости к инфекции
Герпесвирусы 6, 7, 8	В	В	В	Б	В	Значимость культуры клеток варьирует в зависимости от вируса (не применима для 8-го типа); иммунологические методы являются методами выбора, но не общедоступны; микроскопия может использоваться в эпидемиологических целях
Вирус иммунодефицита человека	Б	Б	Г	А	А	Определение антигена р24 используется для ранней диагностики и мониторинга; количественный анализ вирусной РНК является важным для оценки эффективности противовирусной терапии
Вирус папилломы человека	Г	В	Б	А	В	Детекция кондилоцитов и позднего структурного антигена вируса в биоптате используется для диагностики; молекулярные методы могут быть использованы при наличии соответствующих материалов и оборудования
Парвовирусы	Г	В	В	А	А	Молекулярные методы используются при наличии соответствующих реагентов и оборудования; серологические методы используются наиболее широко для диагностики и эпидемиологических исследований, но неприемлемы для пациентов с иммунодефицитными состояниями
Вирус гриппа	А	А	А	В	Б	РИФ и ИФА материала из носа используются для быстрой диагностики; серологические методы обычно используются в целях эпидемиологической диагностики
Вирус кори	Б	В	Б	Б	А	Серологические методы используются для определения иммунного ответа на инфекцию и восприимчивости к инфекции; ПЦР является методом выбора для диагностики инфекции ЦНС
Вирус эпидемического паротита	А	В	Б	Б	А	Имунофлюоресцентная микроскопия используется для детекции вирусных антигенов в материале из респираторных органов; ПЦР является методом выбора для диагностики инфекции ЦНС; серологические методы используются для оценки иммунного ответа и восприимчивости к инфекции
Вирус парагриппа	А	В	А	В	В	ИФА материала из носа используется для быстрой диагностики

1	2	3	4	5	6	7
Вирус полиомиелита	Г	Г	В	А	Г	<i>In situ</i> ДНК-гибридизация используется для обнаружения вируса в тканях; ПЦР используется для исследования спинномозговой жидкости и крови
Поксвирусы	Б	Г	Б	Б	А	Значение культуры клеток варьирует в зависимости от типа вируса; электронная микроскопия используется в специально оборудованных лабораториях; серологические методы используются наиболее широко, но требуют специальных реагентов и экспертной оценки
Вирус бешенства	Г	Г	Б	В	В	–
Респираторно-синцитиальный вирус	А	А	А	В	В	Имунофлюоресцентная микроскопия используется для детекции вирусных антигенов в материале из респираторного тракта
Риновирусы	А	В	В	В	Г	Для дифференциации от энтеровирусов в культуре клеток необходим тест на кислотостойчивость или какой-либо другой специфичный тест
Ротавирусы	Г	А	Б	В	Г	Электронная микроскопия используется в специально оборудованных лабораториях
Вирус краснухи	Б	Г	В	Б	А	Определение IgM антител используется для диагностики первичной инфекции, особенно у новорожденных, IgG антител – для определения восприимчивости к инфекции и сероконверсии (при исследовании парных сывороток крови)
Трансмиссивные возбудители спонгиозной энцефалопатии	Г	Г	В	Г	Г	Экспериментальное заражение животных и другие экспериментальные методы только в специализированных лабораториях
Вирус опоясывающего герпеса	А	Г	А	В	Б	Однослойная микрокультура клеток (<i>shell vial</i>) может быть использована для быстрой детекции репликации вируса; РИФ используется для обнаружения вируса в кожных элементах; серологические методы используются для определения восприимчивости к инфекции

* Культура клеток - культивация вируса непосредственно из клинического материала с использованием культуры клеток (или тканей) и технологий, доступных практически во всех вирусологических лабораториях. Иммунологические методы – детекция вирусных антигенов в клиническом материале с помощью ИФА и РИА. Микроскопия – обнаружение вирусных антигенов или вирусов с помощью световой или электронной микроскопии. Световая микроскопия включает ИФА и другие подобные методы. Электронная микроскопия подразумевает визуализацию вирусов с помощью электронного микроскопа.

более быстрыми (2–24 ч). Однако из-за ряда особенностей возбудителей прямые методы имеют свои ограничения (возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов). Поэтому они часто требуют подтверждения непрямими методами.

Электронная микроскопия (ЭМ). С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Для успешного определения вируса его концентрация в пробе должна быть примерно $1 \cdot 10^6$ частиц в 1 мл. Но поскольку концентрация возбудителя, как

правило, в материале от больных незначительна, то поиск вируса затруднен и требует предварительного его осаждения с помощью высокоскоростного центрифугирования с последующим негативным контрастированием. Кроме того, ЭМ не позволяет типировать вирусы, так как у многих из них нет морфологических различий внутри семейства. Например, вирусы простого герпеса, цитомегалии или опоясывающего герпеса морфологически практически неотличимы.

Одним из вариантов ЭМ, используемым в диа-

Таблица 2. Сравнение различных подходов к диагностике вирусных инфекций [1]

Методы	Время	Преимущества	Недостатки
Культура клеток	Дни – недели	Высокая специфичность и чувствительность; возможность дальнейшей работы с выделенным вирусом	Необходимость в специальном оборудовании, длительность
Прямые методы диагностики	Часы – 1 день	Быстрота; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов; сложность одновременного проведения большого количества исследований
Серологические	Недели	Определение иммунного ответа на вирус; применимость для вирусов, которые сложно культивировать	Возможность перекрестных реакций; во многих случаях необходимы парные сыворотки крови

гностических целях, является *иммунная электронная микроскопия* (ИЭМ), при которой применяются специфические антитела к вирусам. В результате взаимодействия антител с вирусами образуются комплексы, которые после негативного контрастирования легче обнаруживаются.

ИЭМ несколько более чувствительна, чем ЭМ, и используется в тех случаях, когда вирус не удается культивировать *in vitro*, например при поиске возбудителей вирусных гепатитов [1].

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ). Метод основан на использовании антител, связанных с красителем, например флюоресцеинизотиоцианатом. РИФ широко применяется для выявления вирусных антигенов в материале больных и для быстрой диагностики.

В практике применяются два варианта РИФ: прямой и непрямой. В первом случае применяются меченные красителем антитела к вирусам, которые наносятся на инфицированные клетки (мазок, культура клеток). Таким образом, реакция протекает одноэтапно. Неудобством метода является необходимость иметь большой набор конъюгированных специфических сывороток ко многим вирусам.

При непрямом варианте РИФ на исследуемый материал наносится специфическая сыворотка, антитела которой связываются с вирусным антигеном, находящимся в материале, а затем наслаивается антивидовая сыворотка к гамма-глобулинам животного, в котором готовилась специфическая иммунная сыворотка, например антикроличья, антилошадиная и т. п. Преимущество непрямого варианта РИФ состоит в потребности лишь одного вида меченых антител.

Метод РИФ широко применяется для быстрой расшифровки этиологии острых респираторных вирусных инфекций при анализе мазков-отпечатков со слизистой оболочки верхних дыхательных путей [2, 3]. Успешное применение РИФ для пря-

мой детекции вируса в клиническом материале возможно лишь в случае содержания в нем достаточно большого числа инфицированных клеток и незначительной контаминации микроорганизмами, которые могут давать неспецифическое свечение.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Иммуноферментные методы определения вирусных антигенов в принципе сходны с РИФ, но основываются на мечении антител ферментами, а не красителями. Наиболее широко используется пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза, применяют также β -галактозидазу и β -лактамазы [4]. Меченые антитела связываются с антигеном, и такой комплекс обнаруживается при добавлении субстрата для фермента, с которым конъюгированы антитела. Конечный продукт реакции может быть в виде нерастворимого осадка, и тогда учет проводится с помощью обычного светового микроскопа, или в виде растворимого продукта, который обычно окрашен (или может флюоресцировать или люминесцировать) и регистрируется инструментально.

Поскольку с помощью ИФА можно измерять растворимые антигены, то не требуется наличия интактных клеток в образце и таким образом могут использоваться различные виды клинического материала.

Другое важное преимущество метода ИФА – возможность количественного определения антигенов, что позволяет применять его для оценки клинического течения болезни и эффективности химиотерапии. ИФА, как и РИФ, может применяться как в прямом, так и в непрямом варианте.

Твердофазный ИФА, дающий растворимый окрашенный продукт реакции, нашел наибольшее распространение. ИФА может быть использован как для определения антигена (тогда на твердую фазу – дно лунки полистиролового планшета – наносятся антитела), так и для определения антител (тогда на твердую фазу наносятся антигены) [5, 6].

Таблица 3. Методы серологической диагностики некоторых вирусных инфекций [1]

Возбудители	Тест	Комментарии
Респираторные инфекции:		
вирусы гриппа А и В	РСК, РТГА	РСК – для стабильного типоспецифичного антигена; РТГА – для штаммоспецифичного антигена
вирус парагриппа	РТГА, РСК, ИФА	Частые перекрестные реакции с другими парамиксовирусами
респираторно-синцитиальный вирус	РСК, ИФА	ИФА является наиболее чувствительным
аденовирусы	РСК, ИФА	Определяется группоспецифичный антиген
Инфекций центральной нервной системы:		
энтеровирусы	РСК, РН, ИФА	Необщедоступно, используется параллельно с выделением вируса
вирус паротита	РТГА, РИФ, ИФА	Частые перекрестные реакции с другими парамиксовирусами
вирус простого герпеса	РСК, РНГА, ИФА, РИФ	Малоинформативно для диагностики инфекции
Гепатита:		
вирус гепатита А	РИА, ИФА	IgM антитела для диагностики
вирус гепатита В	РИА, ИФА	Определение IgM анти-НВс антител; предпочтительнее использовать непосредственное определение вирусных антигенов
Инфекций с преимущественными кожными проявлениями:		
вирус краснухи	РИФ, ИФА, РСК	С целью диагностики или подтверждения наличия иммунитета
вирус опоясывающего герпеса	РСК, РИФ	Только для диагностики инфекции Для подтверждения наличия иммунитета
Других инфекций:		
вирус цитомегалии	РСК, РНГА, ИФА, РИФ	Ограниченное применение (за исключением скрининга донорской крови и органов)
краснуха	ИФА, РИФ	Стандартный подход к диагностике
вирус Эпштейна–Барра	Гетерофильный тест РИФ	Стандартный метод, возможность негативного результата, особенно у детей Для диагностики в проблемных случаях

Радиоиммунный анализ (РИА). Метод основан на метке антител радиоизотопами, что обеспечивало высокую чувствительность в определении вирусного антигена. Широкое распространение метод получил в 80-е годы, особенно для определения маркеров HBV и других некультивируемых вирусов. К недостаткам метода относится необходимость работать с радиоактивными веществами и использования дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

Молекулярные методы. Первоначально классическим методом выявления вирусного генома считался высокоспецифичный метод гибридизации НК, но в настоящее время все шире используется выделение геномов вируса с помощью *полимеразной цепной реакции (ПЦР)*.

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот. Метод основан на гибридизации комплементарных нитей ДНК или РНК с образованием дву-

нитевых структур и на выявлении их с помощью метки. Для этой цели используются специальные ДНК- или РНК-зонды, меченные изотопом (^{32}P) или биотином, обнаруживающие комплементарные нити ДНК или РНК. Существуют несколько вариантов метода:

- точечная гибридизация – выделенную и денатурированную НК наносят на фильтры и затем добавляют меченый зонд; индикация результатов – автордиография при использовании ^{32}P или окраска – при авидин-биотине;

- блот-гибридизация – метод выделения фрагментов НК, нарезанных рестрикционными эндонуклеазами из суммарной ДНК и перенесенных на нитроцеллюлозные фильтры и тестируемые мечеными зондами; используется как подтверждающий тест при ВИЧ инфекции;

- гибридизация *in situ* – позволяет определять НК в инфицированных клетках [7].

ПЦР основана на принципе естественной репликации ДНК. Суть метода заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирусспецифической последовательности ДНК с помощью термостабильной Taq ДНК-полимеразы и двух специфических затравок – так называемых праймеров.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различным температурным режимом. В каждом цикле удваивается число копий синтезируемого участка. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, что позволяет за 25–35 циклов наработать достаточное число копий выбранного участка ДНК для ее определения, как правило, с помощью электрофореза в агарозном геле.

Метод высокоспецифичен и очень чувствителен. Он позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК в исследуемом материале. В последние годы ПЦР находит все более широкое применение для диагностики и мониторинга вирусных инфекций (вирусы гепатитов, герпеса, цитомегалии, папилломы и др.) [8, 9].

Разработан вариант количественной ПЦР, позволяющий определять число копий амплифицированного сайта ДНК. Методика проведения сложна, дорогостояща и пока недостаточно унифицирована для рутинного применения.

Цитологические методы в настоящее время имеют ограниченное диагностическое значение, но при ряде инфекций по-прежнему должны применяться. Исследуются материалы аутопсии, биопсии, мазки, которые после соответствующей обработки окрашиваются и анализируются под микроскопом. При цитомегаловирусной инфекции, например, в срезах ткани или в моче обнаруживаются характерные гигантские клетки – “совиный глаз”, при бешенстве – включения в цитоплазме клеток (тельца Бабеша–Негри). В некоторых случаях, например при дифференциальной диагностике хронических гепатитов, имеет значение оценка состояния ткани печени.

Непрямые методы диагностики

Выделение вирусов – один из самых старых и трудоемких методов диагностики. Однако и сегодня выделение вируса с последующей идентификацией с помощью одного из современных методов (ИФА с моноклональными антителами или ПЦР) является наиболее достоверным методом диагностики – так называемый “золотой стандарт”.

Для успешного выделения вирусов клинический материал должен быть взят в соответствии с

патогенезом предполагаемого заболевания и в наиболее ранние сроки.

Как правило, берутся:

- при респираторных инфекциях – носоглоточный смыв;
- при энтеровирусных инфекциях – смыв и фекалии (рео-, энтеровирусы);
- при поражениях кожи и слизистых оболочек – соскобы, содержимое пузырьков (герпес, ветряная оспа);
- при экзантемных инфекциях – смывы (корь, краснуха);
- при арбовирусных инфекциях – кровь, спинномозговая жидкость.

Для выделения вирусов используют культуры клеток, лабораторных животных, эмбрионы кур. Процесс длительный, иногда требующий проведения нескольких пассажей, прежде чем вирус будет обнаружен и идентифицирован с помощью одного или нескольких методов – в *реакции нейтрализации* (РН), РИФ, ИФА или ПЦР.

В настоящее время в большинстве случаев выделение вирусов заменено обнаружением вирусспецифических антигенов в инфицированных клеточных культурах с помощью указанных методов. Для этих целей широко применяются моноклональные антитела, особенно к ранним белкам возбудителя в РИФ или ИФА. Такой подход позволяет получить ответ уже через 24–72 ч после инфицирования клеток культуры тканей.

Серодиагностика

Серологическая диагностика, основанная на реакции антиген – антитело, может быть использована для определения как тех, так и других, и играет роль в определении этиологии вирусной инфекции даже при отрицательных результатах выделения вируса.

Успех серологической диагностики зависит от специфичности реакции и соблюдения временных условий взятия крови, необходимых для синтеза организмом антител.

В большинстве случаев используют парные сыворотки крови, взятые с интервалом в 2–3 нед. Положительной реакция считается по крайней мере при 4-кратном нарастании титра антител. Известно, что большинство специфических антител относятся к классам IgG и IgM, которые синтезируются в различное время инфекционного процесса. При этом IgM антитела относятся к ранним, и тесты, используемые для их определения, применяются для ранней диагностики (достаточно исследовать одну сыворотку). Антитела класса IgG синтезируются позже и длительно сохраняются.

Для типирования вирусов применяется РН, при группоспецифической диагностике, например, аденовирусной инфекции, используют *реакцию связывания комплемента* (РСК). Наиболее употребительными являются *реакция торможения гемагглютинации* (РТГА), РСК, РИФ, *реакции пассивной и обратной пассивной гемагглютинации* (РПГА, РОПГА), различные варианты ИФА, практически повсеместно заменившего равный ему по чувствительности РИА.

РТГА используется для диагностики заболеваний, вызванных гемагглютинирующими вирусами. Она основана на связывании антителами сыворотки больного добавленного стандартного вируса. Индикатором реакции являются эритроциты, агглютинирующиеся вирусом (формирование характерного “зонтика”) при отсутствии специфических антител и оседающие на дно неагглютинированными при их наличии.

РСК является одной из традиционных серологических реакций и используется для диагностики многих вирусных инфекций. В реакции принимают участие две системы: антитела сыворотки больного + стандартный вирус и эритроциты барана + антитела к ним, а также оттитрованный комплемент. При соответствии антител и вируса этот комплекс связывает комплемент и лизиса бараньих эритроцитов не происходит (положительная реакция). При отрицательной РСК комплемент способствует лизису эритроцитов. Недостатком метода является его недостаточно высокая чувствительность и трудность стандартизации реагентов.

Для учета значимости РСК также, как и РТГА, необходимо титрование парных сывороток, то есть взятых в начале заболевания и в период реконвалесценции.

РПГА – агглютинация sensibilizированных вирусными антигенами эритроцитов (или полистироловых шариков) в присутствии антител. На эритроцитах могут быть сорбированы любые вирусы, независимо от наличия или отсутствия у них гемагглютинирующей активности. В связи с наличием неспецифических реакций сыворотки исследуются в разведении 1:10 и более.

РНГА – агглютинация эритроцитов, sensibilizированных специфическими антителами в присутствии вирусных антигенов. Наибольшее распространение РОПГА получила при выявлении НВs-антигена как у больных, так и у доноров крови.

ИФ метод также, как *ИФА*, применяется для определения антител в сыворотке. Все большее значе-

ние и распространение получает ИФА для диагностических целей. На твердую фазу (дно лунок полистироловых планшет или полистироловые шарики) сорбируется вирусный антиген. При добавлении соответствующих антител, находящихся в сыворотке, происходит их связывание с сорбированными антигенами. Наличие искомого антител обнаруживается с помощью анти-антител (например, человеческих), конъюгированных с ферментом (пероксидазой). Добавление субстрата и реакция субстрат – фермент дают окраску. ИФА может быть использована и для определения антигенов. В этом случае на твердую фазу сорбируются антитела.

Моноклональные антитела. Большой прогресс в диагностике вирусных инфекций достигнут в последнее десятилетие, когда с развитием генно-инженерных исследований была разработана система получения моноклональных антител. Тем самым были резко повышены специфичность и чувствительность диагностических методов определения вирусных антигенов. Узкая специфичность моноклонов, представляющих небольшую долю вирусных белков, которые могут не присутствовать в клиническом материале, успешно преодолевается использованием нескольких моноклональных антител к различным вирусным детерминантам.

Заключение

Количество методов, используемых для диагностики вирусных инфекций, непрерывно растет. Одни уходят в прошлое и имеют в основном историческое значение, другие совершенствуются. Несомненно, что технический прогресс в определении антител, белкового анализа и генодиагностики наряду с расширением наших знаний вирусов и патогенеза вирусных инфекций приведут к появлению новых высокоспецифичных и высокочувствительных методов, удобных для клинического применения.

В настоящее время выпускается большое количество коммерческих сертифицированных тест-систем, в том числе и отечественных, для диагностики наиболее распространенных и социально значимых вирусных инфекций. Государственный реестр содержит более 600 диагностических препаратов. Однако далеко не для всех групп вирусов имеются диагностические тест-системы. Например, из большой группы энтеровирусов (более 80 членов) только для определения вирусов полиомиелита имеются тест-системы, в то же время для диагностики ВИЧ-инфекции выпускается более 15 различных наборов.

Л и т е р а т у р а

1. Konen E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger, Washington C.W. Jr., editors. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 1177-265.
2. Cherry W.B. Immunofluorescence techniques. In: Lennette E.H., Balows A., Hausler W.J.Jr., Triant J.P., editors. Manual of clinical microbiology. 3d ed. Washington: D.C. Am Soc Microbiol 1980: 501-8.
3. Gardner P.S., McQuillin J. Rapid Virus diagnosis: application of immunofluorescence. 2nd ed. London: Butterworth; 1980.
4. Averameas S., Ternynck T., Guesdon J.L. Coupling of enzymes to antibodies and antigens. Scand J Immunol 1978;8:7-23.
5. Исаева Е.И., Ровнова З.И., Колобухина Л.В., Алипова Т.А., Меркулова Л.Н., Стаханова В.М. Этиологическая структура заболеваемости гриппом в 1988–1996 гг. Эпидемиол и инфекц бол 1996;3:10-4.
6. Букринская А.Г. Вирусология. М.: Медицина; 1986.
7. Fox J.C., Griffiths P.D., Emery V.C. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA using the polymerase chain reaction. J Gen Virol 1992;73:2405-8.
8. Шипулина О.Ю., Шахгильдян В.И., Шипулин Г.А., Кравченко А.В., Серебровская Л.В., Покровский В.В. Полимеразная цепная реакция в диагностике цитомегаловирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных пациентов. Вopr вирусол 1998;2:91-5.
9. Walmsley S., Mazzulli T., Krajden M. Long-Term Predictive Value of a Single Cytomegalovirus (CMV) DNA PCR Assay for CMV Disease in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. J Clin Microbiol 1998;36(1):281-3.
10. Yolken R.H., Lennette D.A., Smith T.F., Waner J.L. Algorithms for detection and identification of viruses. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H., editors. Manual of clinical microbiology. 7th ed.; 1999. p.843-6.