

Received: 2011.12.16
Accepted: 2012.04.25
Published: 2012.06.28

Metody wykrywania wybranych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego

Methods of detection of selected respiratory viruses

Ilona Stefańska^{1,2}, Magdalena Romanowska¹, Lidia B. Brydak^{1,3}

¹ Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

² Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa

³ Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie

Wirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego są istotną przyczyną zachorowań i zgonów u osób zdrowych, jak i tych z obniżoną odpornością oraz pociągają za sobą znaczące koszty ekonomiczne w systemie opieki zdrowotnej. Podobne objawy kliniczne w przebiegu różnych zakażeń układu oddechowego o etiologii wirusowej i bakteryjnej sprawiają, że postawienie właściwej diagnozy jest trudne. Trafna i szybka diagnostyka ma podstawowe znaczenie w kontroli zakażeń i podjęcia decyzji odnośnie postępowania z pacjentem, a zwłaszcza zastosowania odpowiedniej terapii przeciwbakteryjnej lub przeciwwirusowej oraz hospitalizacji. Ponadto identyfikacja czynnika etiologicznego choroby pozwala wyeliminować niemające uzasadnienia użycie antybiotyków, a także obniżyć koszty opieki medycznej.

W przypadku wykrywania wirusów odpowiedzialnych za zakażenia układu oddechowego zastosowanie ma wiele różnych procedur diagnostycznych. Przez wiele lat podstawowymi metodami używanymi w rutynowej diagnostyce było wykrywanie antygenów wirusa oraz izolacja wirusa w hodowli komórkowej. Niemniej jednak w ostatnim czasie techniki amplifikacji kwasów nukleinowych zaczęły być szeroko stosowane, przy czym znacząco poprawiły czułość wykrywania wirusów w próbkach klinicznych. Testy diagnostyczne oparte na biologii molekularnej przyczyniły się tym samym do lepszego wykrywania koinfekcji (reakcje multiplex) oraz umożliwiły wykrywanie wirusów trudnych do namnażania w hodowlach.

W artykule omówiono wiele technicznych aspektów obecnie używanych technik, ich podstawowe zasady, zalety, wartość diagnostyczną, ale również pewne ograniczenia.

Słowa kluczowe:

diagnostyka • PCR • wirus • wirusowe zakażenie układu oddechowego

Summary

Respiratory viruses contribute to significant morbidity and mortality in healthy and immunocompromised individuals and are considered as a significant economic burden in the healthcare system. The similar clinical symptoms in the course of different viral and bacterial respiratory infections make the proper diagnosis difficult. An accurate and prompt diagnostics is crucial for infection control and patient management decisions, especially regarding the use of antibacterial or antiviral therapy and hospitalization. Moreover, the identification of the causative agent eliminates inappropriate use of antibiotics and may reduce the cost of healthcare.

A wide variety of diagnostic procedures is applied for the detection of viral agents responsible for respiratory tract infections. For many years, the viral antigen detection and standard isolation technique in cell culture was the main method used in routine diagnostics. However, in recent

years the nucleic acid amplification techniques have become widely used and have significantly improved the sensitivity of viral detection in clinical specimens. Molecular diagnostic assays have contributed to revealing high rates of co-infection (multiplex reactions) and allow identification of agents that are difficult to culture.

This paper discusses a number of technical aspects of the current most commonly used techniques, their general principles, main benefits and diagnostic value, but also some of their limitations.

Key words: diagnostics • PCR • virus • viral respiratory tract infection

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1001898>

Word count: 4793

Tables: –

Figures: –

References: 54

Adres autorki: dr n. wet. Ilona Stefańska, Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: i.stefanska@gmail.com

WSTĘP

Wirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego są jedną z najczęstszych przyczyn zachorowań u ludzi. Do najważniejszych i najbardziej rozpowszechnionych należą m.in. wirus grypy A i B (IV-A, -B), wirus RS typu A i B (RSV-A, -B), wirus paragrypy 1, 2, 3 i 4 (PIV-1, -2, -3, -4), metapneumowirusy (hMPV), adenowirusy (hAdV), koronawirusy (hCoV), rinowirusy (hRV), enterowirusy (EV) oraz bokawirus (hBoV) [12,23,32]. Wirusy te charakteryzuje duża chorobotwórczość oraz łatwa transmisja, dzięki czemu mogą szybko rozprzestrzeniać się, zwłaszcza w miejscach o znacznym zagęszczeniu ludzi, takich jak środki lokomocji, urzędy, szkoły czy przedszkola [36]. Mimo ich powszechnego występowania i często łagodnego przebiegu zakażenia, niektóre z nich mogą stanowić poważny problem zdrowotny, kończący się powikłaniami, a nawet zgonem. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) podaje, że zakażenia dróg oddechowych stanowią drugą, co do częstości występowania przyczyną zgonów u dzieci do 5 roku życia [33]. Corocznie z powodu grypy choruje na świecie od 330 mln do 1575 mld, a umiera od 0,5 mln do miliona osób [6]. Przypadki ciężkich zakażeń występują najczęściej u osób z grup wysokiego ryzyka bez względu na wiek, dzieci do 24 miesiąca, a także osoby starsze. Ponadto osłabiony zakażeniem wirusowym organizm staje się podatny na inwazję innymi patogenami, co może prowadzić do różnego rodzaju zakażeń wtórnych.

Zakażenia wirusami atakującymi drogi oddechowe kończące się zgonem występują nie tylko u osób z grup wysokiego ryzyka. Sytuacja taka dotyczy wyjątkowo patogennych wirusów, do których należy wirus grypy. Dobrym przykładem obrazującym skalę problemu może być pandemia z 1918 roku zwana „hiszpanką”, która jak się szacuje spowodowała w tamtym okresie zgon 50–100 milionów osób [25]. Obecnie coraz częściej pojawia się problem ptasiej grypy wywołanej głównie przez wysoce patogeny podtyp wirusa A/H5N1 (highly pathogenic avian influenza – HPAI), który (wg raportu WHO z dn. 29.11.2011) z niemal 60% śmiertelnością spowodował zgon 335 osób.

Z kolei koronawirus SARS (SARS-CoV), wywołujący zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej (SARS – severe acute respiratory syndrome), spowodował zakażenie u ponad 8000 osób, w tym 774 zgony (wg raportu WHO z dn. 21.04.2004).

Poważnym zagrożeniem dla zdrowia i życia człowieka są różnego rodzaju powikłania wynikające nie tylko z działania samego wirusa, lecz mogące powstawać na skutek reakcji układu immunologicznego gospodarza oraz zakażeń wtórnych. Do najczęstszych powikłań należą: zapalenie płuc i oskrzeli (w tym wywołane wtórnymi zakażeniami wirusowymi bądź bakteryjnymi np. przez *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* sp.), zwłóknienie płuc, zapalenie oskrzelików płucnych u niemowląt i u dzieci, zapalenie mięśnia serca i osierdzia, odrzuty przeszczepów, zapalenie ucha środkowego, zapalenie mięśni, a także powikłania ze strony układu nerwowego i moczowego itp. [6,21,22].

DIAGNOSTYKA WIRUSOLOGICZNA ZAKAŻEŃ UKŁADU ODDECHOWEGO

Trudności w różnicowaniu klinicznym chorób o etiologii wirusowej i bakteryjnej prowadzą często do nieuzasadnionego stosowania antybiotyków. Przy zakażeniach układu oddechowego wywołanych przez różne wirusy mogą występować podobne i mało swoiste objawy kliniczne, co utrudnia rozpoznanie na ich podstawie czynnika etiologicznego i postawienie właściwej diagnozy. Jednocześnie zakażenia wywołane tym samym wirusem mogą prowadzić do wystąpienia zróżnicowanych objawów, w zależności np. od wieku czy kondycji pacjenta. Z tego powodu rozpoznanie i leczenie nie powinno opierać się jedynie na obrazie klinicznym choroby. Bardzo ważną jest diagnostyka laboratoryjna pozwalająca na dokładną identyfikację patogenu wywołującego chorobę i umożliwiająca podjęcie właściwej decyzji o sposobie leczenia chorego.

Ukierunkowane leczenie możliwe jest w przypadku zakażeń dróg oddechowych wywołanych tylko przez niektóre

wirusy. W leczeniu grypy z powodzeniem stosowane są inhibitory neuraminidazy, takie jak oseltamiwir bądź zanamawir. Leki te są nieskuteczne w przypadku zakażeń wywołanych przez inne wirusy atakujące układ oddechowy. Badania dotyczące leczenia pacjentów oseltamiwirem i zanamawirem wykazały, że niemal u 50% osób nie było wskazań medycznych do podania leku, gdyż zakażenie nie było wywołane przez wirus grypy [7]. Innymi lekami przeciwgrypowymi, jednak obecnie mniej skutecznymi, ze względu na powszechne występowanie oporności wśród krążących szczepów oraz wywołującymi działania niepożądane, są amantadyna i rymantadyna. Leki te charakteryzuje duża wybiórczość, gdyż celem ich działania jest białko M2, obecne jedynie w strukturze wirusa grypy A [7]. Dodatkowo wszystkie te leki, aby wykazały skuteczność muszą zostać podane nie później niż 36 godz. od wystąpienia pierwszych objawów. W przypadku innych wcześniej wymienionych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego nie ma żadnych swoistych leków przeciwwirusowych.

Postawienie trafnej diagnozy w krótkim czasie pozwala uniknąć niepotrzebnej, często wyniszczającej organizm i mogącej wywoływać działania niepożądane, terapii lekami antywirusowymi, a w razie uzyskania wyniku potwierdzającego obecność patogenu umożliwia zastosowanie celowanej terapii przeciwwirusowej. Racjonalne, właściwie wdrożone i podjęte w odpowiednim czasie leczenie obniża niebezpieczeństwo pojawienia się ukierunkowanych mutacji prowadzących do oporności na stosowany lek, skraca czas pobytu pacjenta w szpitalu, obniża koszty leczenia i hospitalizacji, a także zapobiega szerzeniu się zakażenia wśród ludzi [5]. Istotne znaczenie w zapobieganiu zakażeń wirusem grypy może mieć wdrożenie celowanej terapii przeciwwirusowej nie tylko u chorych, ale i u członków rodziny i innych osób mających kontakt z chorymi. Problematyka ta jest ściśle związana także z kontrolą i zapobieganiem zakażeniom szpitalnym, dając możliwość ograniczenia szerzenia się zakażenia z pacjenta na pacjenta oraz na pracowników służby zdrowia.

W przypadku wirusa grypy szczegółowa i dokładna diagnostyka niesie za sobą jeszcze inny ogromnie ważny aspekt. Dane dotyczące właściwości antygenowych szczepów izolowanych w różnych miejscach na świecie, prowadzą do ustalenia odpowiedniego składu szczepionki przeciwgrypowej na dany sezon epidemiczny, co w efekcie prowadzi do jej zwiększonej skuteczności. Oprócz oznaczeń prowadzonych tzw. testami przyłóżkowymi, umożliwiającymi szybkie wykrycie wirusa grypy, niezwykle ważne są wysokospecjalistyczne badania jakie oferują Krajowe Ośrodki ds. Grypy. Analizy te obejmują m.in. diagnostykę molekularną, połączoną z kolekcjonowaniem szczepów krążących w populacji w kolejnych sezonach.

METODY WYKRYWANIA WIRUSÓW WYWOŁUJĄCYCH ZAKAŻENIA UKŁADU ODDECHOWEGO

Do tradycyjnych metod diagnostycznych mających na celu identyfikację wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego w materiale pobranym od pacjenta należą testy, których zasada polega na wykrywaniu antygenów wirusowych, w tym testy immunofluorescencyjne, immunoenzymatyczne np. test ELISA i immunochromatograficzne oraz

metody oparte na uzyskaniu hodowli wirusa (z wykorzystaniem zarodków ptasich lub hodowli tkankowych). Analizy serologiczne są znacznie szybsze i mniej kosztowne, jednak często charakteryzuje je mniejsza czułość i swoistość w porównaniu z metodami izolacji w hodowli.

WYKRYWANIE ANTYGENÓW WIRUSOWYCH

Jednym z najczęściej stosowanych testów umożliwiających wykazanie obecności antygenów określonego wirusa w próbkach klinicznych, takich jak np. popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), aspiraty nosowo-gardłowe, wymazy z nosa i gardła są testy immunofluorescencyjne (IF). W metodzie tej można wykorzystywać swoiste przeciwciała skoniugowane bezpośrednio z fluorochromem (fluoresceiną) i skierowane przeciwko określonym antygenom danego wirusa (metoda bezpośrednia) lub niewyznakowane swoiste przeciwciała, a następnie znakowane fluorochromem przeciwciała antyglobulinowe (metoda pośrednia). Wynik reakcji uzyskuje się w postaci emitujących zielone światło kompleksów powstałych w miejscu związania wyznakowanego fluoresceiną przeciwciała z antygenem wirusowym lub kompleksem antygen-przeciwciała, widocznych na tle kontrastowo wybarwionych komórek ludzkiego nabłonka (odczyt w mikroskopie fluorescencyjnym).

Immunofluorescencja bezpośrednia (DIF) jest metodą szybszą, ale mniej czułą. Wykorzystanie w teście IF przeciwciał monoklonalnych umożliwia nie tylko wykrycie danego patogenu, ale także pozwala na określenie jego typu, co może mieć ważne znaczenie w przypadku badań epidemiologicznych, a także aspekt terapeutyczny (leki przeciwwirusowe działające swoiście na określony typ wirusa, jak wspomniana wcześniej amantadyna i rymantadyna). W ciągu ostatnich lat przeciwciała monoklonalne oraz gotowe zestawy IF umożliwiające wykrywanie antygenów najbardziej istotnych klinicznie wirusów stały się dostępne i powszechnie stosowane w diagnostyce zakażeń układu oddechowego. Należy jednak podkreślić, że analiza i interpretacja wyników uzyskanych metodą IF jest często żmudna i subiektywna, zależna w dużym stopniu od doświadczenia i kompetencji osoby badającej. Niewielkie stężenie cząstek wirusowych w drogach oddechowych i w pobranym materiale oraz duża ilość śluzu, a przede wszystkim brak lub niewielka liczba nienaruszonych komórek w badanym materiale mogą prowadzić do fałszywie ujemnych wyników. Próbki do badań IF muszą być transportowane i przechowywane w odpowiednich warunkach, w niskiej temperaturze, ale bez mrożenia, a badanie należy wykonać jak najszybciej od pobrania próbki, aby zapobiec uszkodzeniu komórek. Jedynie test IF pozwala na ocenę jakościową próbki, gdyż uwidocznioma zostaje liczba komórek obecnych w pobranym materiale. Należy także zaznaczyć, że obraz uzyskany tą metodą jest bardzo nietrwały, gdyż fluorochromy ulegają szybkiemu rozkładowi pod wpływem światła. Obraz fluorescencji może różnić się w zależności od typu mikroskopu czy źródła zastosowanego światła.

Warunki oraz czas transportu próbki mają nieco mniejszy wpływ na wynik badania przy zastosowaniu testu ELISA, gdyż w metodzie tej wykrywa się tylko antygeny wirusowe i stopień uszkodzenia komórek nie wpływa na analizę tak jak w przypadku IF. Testy immunoenzymatyczne wykorzystują przeciwciała monoklonalne skoniugowane

z enzymem (a nie fluorochromem). Antygen (związany uprzednio przez swoiste przeciwciała opłaszczony na płytce) rozpoznawany jest bezpośrednio przez wyznakowane przeciwciała lub pośrednio, poprzez dodanie swoistych niewyznakowanych przeciwciał, a w drugiej kolejności wyznakowanych przeciwciał antyglobulinowych. Metoda ta umożliwia przeprowadzenie analizy półilościowej przez pomiar powstałego barwnego produktu reakcji. Dostępnych jest wiele komercyjnych testów ELISA, które są proste w wykonaniu i interpretacji, a tym samym mniej zależne od umiejętności i doświadczenia wykonującej je osoby, niż wspomniana wcześniej IF. W przypadku braku komercyjnych testów ELISA dla danego patogenu, dużym ograniczeniem może być konieczność samodzielnego przygotowania i wyznakowania swoistych przeciwciał, co jest kosztowne i nie zawsze możliwe do wykonania.

Na rynku dostępne są także szybkie testy, tzw. testy przyłóżkowe, oparte najczęściej na metodach immunochromatograficznych. Pozwalają one na uzyskanie wyniku w ciągu zaledwie 15-30 min, nie wymagają specjalistycznego sprzętu, ani wykwalifikowanego personelu. Jednak ze względu na niską czułość tych testów (Agoritsas i wsp. 2006: 85–69% w zależności od rodzaju pobranego materiału; Grijalva i wsp. 2007: 63%; Uyeke i wsp. 2009: 19–32%) w przypadku uzyskania wyniku ujemnego wymagane jest potwierdzenie z wykorzystaniem innych, bardziej czułych metod diagnostycznych (np. hodowla, IF, badania molekularne). Ponadto szybkie testy antygenowe stosowane są powszechnie w diagnostyce tylko niektórych wirusów oddechowych (głównie wirusa grypy A i B oraz wirusa RS, rzadziej adenowirusów i innych). Brak jest na rynku szybkich testów umożliwiających identyfikację określonych podtypów wirusa grypy.

IZOLACJA I IDENTYFIKACJA WIRUSÓW W HODOWLACH

Wśród konwencjonalnych metod diagnostycznych za złoty standard uważa się metody oparte na hodowli patogenów. Do hodowli wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego najczęściej wykorzystuje się zarodki kurze (wirus grypy), pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z nerki rezusa (RhMK), a także wiele różnych ciągłych, ustalonych linii komórkowych, takich jak A549 (linia komórkowa wyprowadzona z ludzkich komórek nowotworowych raka płuc), HEp-2 (z ludzkich komórek raka krtani), MRC5 (z tkanki płucnej 14-tygodniowego ludzkiego płodu), MDCK (z tkanki nabłonkowej pobranej z nerki psa) czy Vero (z tkanki nabłonkowej pobranej z nerki afrykańskiego koczodana zielonego) [14,19]. Identyfikacja wirusa odbywa się na podstawie charakterystycznych zmian patologicznych w komórce (efekt cytopatyczny) oraz z zastosowaniem metod hemoadsorpcji, immunofluorescencji lub biologii molekularnej.

Izolacja wirusa jest krokiem niezbędnym do przeprowadzenia dokładnej charakterystyki szczepu wirusowego, w tym określenia jego wrażliwości na leki przeciwwirusowe. Umożliwia potwierdzenie obecności w badanych próbkach czynników wirusowych zdolnych do replikacji. Założenie hodowli pozwala na izolację nowego wariantu wirusa, znacznie różniącego się antygenowo/genetycznie od krążących szczepów nowego wirusa, a także kilku wirusów z jednej próbki klinicznej w przypadku koinfekcji.

Jednak hodowla, a następnie identyfikacja wyizolowanego wirusa jest metodą kosztowną i czasochłonną, a czas oczekiwania na wynik jest często zbyt długi (nawet do 2 tygodni), co znacznie ogranicza możliwość jej wykorzystania w praktyce klinicznej. Przyczyną niepowodzeń w prowadzeniu hodowli jest to, że nie wszystkie wirusy mogą replikować się w warunkach *in vitro*, w kulturach komórkowych (np. hMPV, SARS-CoV, CoV NL63, CoV HKU1, hBV) [8,20,36]. Niektóre szczepy do wzrostu wykrywalnego poziomu w warunkach *in vitro* mogą wymagać dłuższego czasu adaptacji, przez co konieczne jest przeprowadzenie kilku pasażów. Poszczególne wirusy wywołujące zakażenia układu oddechowego mają różnicowane wymagania, co może pociągać konieczność użycia dla każdej próbki klinicznej kilku rodzajów linii komórkowych w celu wykrycia różnych wirusów, w tym zakażeń mieszanych. Zastosowanie w ostatnich latach kombinacji kilku odpowiednio wyselekcjonowanych linii komórkowych w pojedynczej hodowli wyeliminowało potrzebę stosowania tych linii oddzielnie. Przykładem może być rosnąca jednowarstwowo hodowla R-Mix (Mixed Fresh Cells™), która zawiera ludzkie komórki nowotworowe płuc (A549) i epitelialne komórki wyprowadzone z płuc norki (Mv1Lu). Komórki Mv1Lu są bardzo wrażliwe na zakażenie wirusem grypy A i B, a połączenie tych komórek z linią A549 zwiększa ich wrażliwość także na inne wirusy związane z układem oddechowym, takie jak hAdV, wirus RS czy PIV-1, -3 [19]. Olbrzymią zaletą hodowli R-Mix jest nie tylko jej zwiększona czułość, ale przede wszystkim dużo szybsze wykrywanie wirusów, możliwe już w 1-3 dniu po zakażeniu. Liczne badania wykazują, że metoda ta jest istotnie bardziej czuła niż DIF i co najmniej tak samo czuła jak standardowe hodowle zawierające komórki tylko jednego rodzaju. Na przykład George i wsp. [16] wykazali, że czułość i swoistość dla hodowli R-Mix wynosiła 100%, podczas gdy dla hodowli z wykorzystaniem konwencjonalnych linii komórkowych odpowiednio 67 i 10%, a dla metody DIF 66 i 98%.

Ponieważ metody oparte na bezpośrednim wykrywaniu antygenów wirusowych są mniej czułe niż izolacja w hodowli, a hodowla jest czasochłonna, aby podwyższyć wiarygodność wyników i skrócić czas analizy, można zastosować w diagnostyce obie te metody, wykrywając białka wirusowe nie w materiale bezpośrednim, ale w hodowlach komórkowych uprzednio zakażonych takim materiałem. Badanie takie wykonuje się zazwyczaj po 24–48 godz. od zakażenia, co z jednej strony opóźnia uzyskanie wyniku i postawienie diagnozy, ale z drugiej strony umożliwia wykrycie wirusa w próbkach, w których występuje nawet niewielka liczba zdolnych do replikacji wirionów.

WYKRYWANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Niezastąpioną metodą, znajdującą coraz szersze zastosowanie w diagnostyce wirusów wywołujących zakażenia dróg oddechowych, wielu zakażeń wirusowych i bakterieryjnych jest wykrywanie materiału genetycznego patogenów z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR). PCR polega na wysoce swoistej amplifikacji wybranego fragmentu kwasu nukleinowego, występującego tylko u danego wirusa i określonego przez sekwencję zastosowanych w reakcji starterów. Wizualizacja powstałych produktów PCR zachodzi poprzez

ich elektroforezę w żelu agarozowym (rzadziej poliakrylamidowym) i wybarwieniu barwnikami fluorescencyjnymi interkalującymi w podwójną nić DNA, takimi jak bromek etydyny. Alternatywą do elektroforezy może być hybrydyzacja produktów amplifikacji ze znakowanymi izotopowo lub enzymatycznie sondami oligonukleotydowymi, komplementarnymi do poszukiwanej sekwencji.

W porównaniu z wieloma innymi metodami wykorzystywanymi w wirusologicznej diagnostyce zakażeń układu oddechowego, PCR jest techniką znacznie szybszą i mniej pracochłonną, a uzyskiwane wyniki są jednoznaczne i łatwe do interpretacji. Największą zaletą tej metody jest bardzo duża czułość, swoistość, a także uniwersalność, polegająca na możliwości badania różnych rodzajów materiałów pobranych od pacjenta. Ponadto reakcja łańcuchowa polimerazy daje bezpośrednią możliwość nie tylko różnicowania pomiędzy typami, ale również określenia podtypu wirusa czy nawet jego wariantu. Podczas ostatniej pandemii grypy w 2009 roku diagnostyka wirusa pandemicznego A(H1N1)2009 opierała się głównie na metodzie PCR, która umożliwia odróżnienie tego wariantu od szczepów grypy sezonowej, w tym także A/H1N1 [43,52].

Różnicowanie podtypów wirusa ma szczególne znaczenie w przypadku wirusów ptasiej grypy w celu rozróżnienia szczepów potencjalnie wysoce patogennych (HPAI, należących do podtypu H5 lub H7) od tych o niskiej patogenności, powszechnie występujących u ptactwa dzikiego i domowego. Dlatego metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy wykorzystywane są do stałego monitorowania stad czy też tuszek drobiowych, jako alternatywa do czasochłonnych metod opartych na izolacji wirusa na zarodkach kurzych, a następnie jego podtypowaniu testem zahamowania hemaglutynacji [41].

Wprowadzenie do rutynowej diagnostyki technik opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych stało się przełomem w diagnostyce wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego i ujawniło dużą częstość występowania zakażeń, które wcześniej nie były diagnozowane z powodu trudności w hodowli niektórych wirusów (np. hMPV, hRV) [2,8,36,47,54]. Metody molekularne stwierdzające obecność materiału genetycznego wirusa umożliwiają identyfikację patogenów, które są trudne lub wręcz niemożliwe do hodowli oraz takich, dla których nie ma komercyjnie dostępnych testów opartych na wykrywaniu antygenów wirusowych.

Większość wirusów wywołujących zakażenia dróg oddechowych to wirusy RNA, o informacji genetycznej zapisanej w postaci sekwencji kwasu rybonukleinowego (wyjątkiem są adenowirusy o dwuniciowym liniowym DNA). W przypadku identyfikacji tych wirusów amplifikacja charakterystycznych fragmentów ich genomu musi zostać poprzedzona przepisaniem informacji genetycznej na sekwencję DNA (powstaje komplementarny DNA – cDNA). Modyfikacja metody PCR, poprzez dodanie etapu odwrotnej transkrypcji, nosi nazwę RT-PCR (**Reverse Transcriptase-PCR**). RT-PCR może występować w dwóch wariantach: jednoetapowym (one-step RT-PCR), gdy zarówno odwrotna transkrypcja, jak i PCR przeprowadzane są w jednej próbce lub dwuetapowym (two-step RT-PCR), gdy przepisanie RNA na cDNA oraz amplifikacja określonych sekwencji

są dwoma rozdzielonymi fizycznie etapami. Liczne badania wskazują, że reakcję dwuetapową charakteryzuje lepsza czułość niż reakcję jednoetapową [31,34,49], ponadto bufor reakcyjny optymalny dla działania odwrotnej transkryptazy może mieć hamujący wpływ na aktywność polimerazy w kolejnym etapie, zmniejszając tym samym wydajność PCR. One-step RT-PCR charakteryzuje się szybszym przebiegiem, a zminimalizowanie liczby etapów ogranicza ryzyko zanieczyszczenia próbki oraz zwiększa powtarzalność uzyskiwanych wyników.

Niewątpliwą zaletą metody PCR jest jej wyjątkowa czułość, gdyż w reakcji dochodzi do wielokrotnego powielenia wybranego odcinka kwasu nukleinowego, teoretycznie nawet około 10 mln razy. Metoda ta jest szczególnie użyteczna, gdy w badanej próbce jest niewielkie miano wirusa lub okres jego wydalania jest krótki, co występuje często np. w przebiegu zakażenia wirusem grypy u osób powyżej 65 roku życia. Koncentracja wirusa może szybko spaść w ciągu kilku pierwszych dni po zakażeniu, skutkiem tego w późnym stadium zakażenia wirus może być niewykrywalny innymi metodami. Jednak taka czułość PCR stanowi niebezpieczeństwo uzyskania wyników fałszywie dodatnich w przypadku zanieczyszczenia próbki DNA/RNA pochodzącym ze środowiska, ponadto RNA jest mniej stabilny niż DNA, a w wyniku niewłaściwego postępowania z materiałem przeznaczonym do badań PCR RNA-zy mogą doprowadzić do zdegradowania kwasu nukleinowego jeszcze przed wykonaniem testu i uzyskaniem fałszywie ujemnych wyników. Na fałszywie ujemne wyniki może wpływać nie tylko obecność w badanej próbce enzymów degradujących RNA (lub DNA), ale także fragmentacja kwasów nukleinowych, błędy w wykonaniu (np. błąd pipetowania), mało wydajna izolacja RNA/DNA, inaktywacja enzymów, a przede wszystkim obecność w próbkach klinicznych inhibitorów PCR. Komórkowe kwasy nukleinowe, białka, sole i inne komórkowe zanieczyszczenia oraz różnego rodzaju pozostałości z odczynników stosowanych do oczyszczania DNA, takich jak etanol, SDS, proteinaza K, EDTA czy fenol, mogą bardzo hamować aktywność enzymatyczną polimerazy DNA. Stauffer i wsp. [42] wykryli obecność inhibitorów PCR w 1,9–2,5% próbek pochodzących z dróg oddechowych. W celu wykrycia obecności w badanej próbce czynników hamujących PCR można wykonać kontrolę wewnętrzną z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji genów referencyjnych, które ulegają stałej ekspresji w komórkach ludzkiego nabłonka, takich jak gen β 2-mikroglobuliny, β -aktyny, γ -aktyny, RNA-azy P, aldolazy czy dekarboksylazy ornityny.

Spośród innych czynników mogących mieć istotny wpływ na wynik badania PCR należy wymienić także dużą zmienność w obrębie sekwencji, do której zaprojektowano starter, gdyż polimeraza Taq tylko do pewnego stopnia toleruje brak całkowitej komplementarności między sekwencją startera i matrycy. Ze względu na dużą zmienność niektórych wirusów (obecność typów, podtypów, wariantów), aby wykryć dany wirus w materiale klinicznym, należy zastosować startery i sondy komplementarne do sekwencji genów wysoce konserwatywnych i regionów charakteryzujących się jak najmniejszą zmiennością w obrębie tych genów u poszczególnych typów czy też podtypów wirusa. Na przykład startery i sondy wykrywające hAdV projektowane są często do regionu genu kodującego białko

heksonowe o dużym stopniu homologii u wszystkich typów adenowirusów [18,39], a w przypadku wirusa RS – do regionu w obrębie genu N uważanego za najbardziej konserwatywny dla obu typów wirusa (RSVA i RSVB) [15]. W przypadku PIV przeważnie wykrywa się gen hemaglutyniny-neuraminidazy, a u hRV i EV sekwencje w obrębie regionu niekodującego (5'-NCR) [29]. Natomiast w przypadku wirusa grypy – najbardziej konserwatywnymi genami są geny kodujące białko M oraz nukleoproteinę, które są najczęściej wykorzystywane do projektowania starterów/sond mających wykrywać wirusa grypy A lub B. Chcąc różnicować szczepy wirusa grypy A należy wykorzystać startery/sondy hybrydujące do regionów konserwatywnych w obrębie genu określonego typu hemaglutyniny i/lub neuraminidazy.

Istotną zaletą PCR jest możliwość sekwencjonowania uzyskanego produktu PCR, co jest wykorzystywane w badaniach epidemiologicznych do oceny pokrewieństwa krążących w populacji wirusów (analiza filogenetyczna), pozwala na porównanie sekwencji tych szczepów z sekwencjami innych szczepów izolowanych w kraju i na świecie, monitorowanie zmienności patogenów, a także umożliwia wykrywanie różnych mutacji w genomie, związanych m.in. z opornością na leki przeciwwirusowe czy z chorobotwórczością danego patogenu.

Jedną z często stosowanych w diagnostyce zakażeń wirusowych modyfikacji PCR jest **nested PCR** (tzw. zagnieżdżony PCR lub gniazdowy PCR), polegający na wykonaniu amplifikacji w dwóch etapach z zastosowaniem różnych par starterów (drugi etap przebiega ze starterami komplementarnymi do sekwencji znajdującej się wewnątrz fragmentu powstałego w pierwszym etapie). Dwie rundy amplifikacji i użycie w każdej z nich innej pary starterów znacznie ogranicza prawdopodobieństwo amplifikacji nieswoistych sekwencji i sprawia, że nested PCR jest techniką bardziej czułą i swoistą niż klasyczny PCR. Jednak zwiększenie liczby etapów powoduje wzrost ryzyka zanieczyszczenia krzyżowego.

Obecnie klasyczny PCR jest coraz częściej wypierany przez **real-time PCR**, czyli PCR z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym. Metoda ta znacznie skraca czas potrzebny na uzyskanie wyniku i postawienie diagnozy, z kilku godzin w przypadku klasycznego PCR do nawet kilkudziesięciu minut w przypadku real-time PCR. Różnica polega przede wszystkim na sposobie wykrywania powstającego w reakcji produktu amplifikacji. Elektroforeza w żelu agarozowym została zastąpiona przez wykrywanie fluorescencji bezpośrednio podczas każdego cyklu reakcji, co znacznie skraca czas analizy. Zachodzi to po zastosowaniu różnego rodzaju formatów detekcji. Najprostszym formatem jest zastosowanie barwnika SYBR Green I, który interkalując w podwójną nić DNA, przy odpowiedniej długości fali sam emituje światło, które jest mierzone po każdym cyklu amplifikacji, dzięki czemu można śledzić przyrost powstającego produktu. Po zakończonej amplifikacji można dodatkowo określić temperaturę topnienia powstałego produktu przez pomiary emisji energii przez barwnik w trakcie powolnego ogrzewania próbki, dzięki czemu uzyskuje się wartość swoistą dla danej sekwencji. Innym sposobem wykrywania jest zastosowanie różnego typu sond (TaqMan, Scorpions, HybProbes, Molecular

Beacons). Są one znakowane fluorochromem i komplementarne do amplifikowanego fragmentu DNA dzięki użytym w reakcji starterom, które dodatkowo zwiększają swoistość badania. Istnieje wiele prac, w których opisano metody wykrywania różnych wirusów wywołujących zakażenia dróg oddechowych za pomocą reakcji real-time PCR, z podanymi sekwencjami sond i starterów [20]. W porównaniu z klasyczną metodą PCR, real-time PCR charakteryzuje się lepszą czułością i swoistością [3,11,31,48].

Pomiar przyrostu produktu amplifikacji po każdym cyklu reakcji daje możliwość określenia wyjściowej zawartości wirusowego RNA/DNA w badanych próbkach. Wartość progowa C_T (cycle threshold) przedstawia liczbę cykli, po których poziom fluorescencji przekracza zdefiniowaną wartość progową i w oparciu o dane krzywej wzorcowej, pozwala oznaczyć liczbę kopii wirusa w mieszaninie na początku reakcji (ilościowy real-time PCR). Dzięki temu real-time PCR jest cennym narzędziem diagnostycznym dającym możliwość przewidywania stanu zakażenia, identyfikację różnych etapów wirusowego zakażenia czy monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej [3,40]. Ilościowy wynik badania może być pomocny w podjęciu decyzji dotyczącej modyfikacji dawki leku przeciwwirusowego np. w przypadku pojawienia się skutków ubocznych lub zmianie leczenia na bardziej skuteczne.

Największą wadą technik opartych na PCR, która najczęściej ogranicza ich zastosowanie w rutynowej diagnostyce (jako metoda pierwszego wyboru) są duże koszty, szczególnie w przypadku diagnostyki nieukierunkowanej na wykrywanie określonego patogenu, kiedy trzeba brać pod uwagę wiele różnych czynników etiologicznych. W celu usprawnienia i obniżenia kosztów badania coraz częściej wykorzystuje się zestawy starterów do identyfikacji więcej niż jednego wirusa w pojedynczej reakcji, tzw. **multiplex PCR (RT-PCR)**. Pozwala to na uzyskanie w jednej mieszaninie reakcyjnej produktów amplifikacji nawet kilku różnych fragmentów DNA, z których każdy jest swoisty dla innego wirusa. Największe zalety reakcji multiplexowych to przede wszystkim mniejsze zużycie odczynników (a tym samym niższy koszt analizy) i matrycowego DNA lub RNA oraz oszczędność czasu, szczególnie w przypadku konieczności badania dużej liczby próbek. Inną niezwykle ważną zaletą reakcji multiplexowych jest możliwość rozpoznania koinfekcji. W przypadku pojedynczych reakcji, po uzyskaniu pozytywnego wyniku często nie wykonuje się dalszych badań w kierunku innych wirusów związanych z zakażeniami dróg oddechowych. Tymczasem liczne badania wskazują, iż mieszane wirusowe zakażenia dróg oddechowych, w tym wywołane przez trzy lub więcej wirusów, mogą stanowić nawet do 20–50% analiz z wynikiem dodatnim [8,12,27,30,35,37,38].

Reakcje multiplexowe są trudne do optymalizacji. Wśród najważniejszych czynników, które mogą obniżyć ich wydajność należy wymienić zwiększone ryzyko powstawania dimerów starterów, dimerów sonda-starter lub nawet sonda-sonda, a także kompetycję między amplikonami o różnej wielkości. Dlatego w przypadku optymalizacji takich reakcji należy zwrócić szczególną uwagę, aby startery i sondy wykorzystywane do identyfikacji poszczególnych wirusów nie tworzyły ze sobą dimerów oraz nie przyłączały się nieswoiście do sekwencji zawartych w genomach innych

wirusów. Należy także pamiętać, że reakcje te powinna charakteryzować czułość porównywalna do czułości pojedynczych reakcji, kiedy to każdy z patogenów wykrywany jest w osobnej próbie. W literaturze opisano dotychczas wiele reakcji multipleksowych mających na celu wykrycie w badanej próbce klinicznej materiału genetycznego różnych wirusów wywołujących zakażenia dróg oddechowych [5,10,32,53]. Dostępne są liczne komercyjne zestawy multipleks PCR przeznaczone do identyfikacji tych patogenów [13,23,27,38].

Porównując czułość różnych metod opartych na PCR z konwencjonalnymi metodami wykorzystywanymi w diagnostyce wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego, w tym uznawaną za złoty standard metodą hodowlaną, liczne dane literaturowe wskazują na przewagę tych pierwszych [4,9,24,28,31,37,44,46,48,53]. PCR umożliwia wykrycie cząstek wirusa niezdolnych do replikacji, a także wymaga mniejszej liczby wirionów niż liczba niezbędna do wywoływania wykrywalnego poziomu hemaglutynacji. Richard i wsp. [37] w testach opartych o metodę amplifikacji określonych fragmentów kwasu nukleinowego wykryli o 83 (47,9%) próbek dodatnich więcej w porównaniu z izolacją wirusów w hodowlach komórkowych. Najbardziej znacząca poprawa nastąpiła w przypadku wykrywania zakażeń wywołanych hRV (21,2% próbki dodatnie w badaniu PCR i zaledwie 2,2% w hodowli). W innych badaniach van Elden i wsp. [48] monitorowali przebieg zakażenia u sześciu pacjentów zakażonych wirusem grypy (2 IV-B i 4 IV-A (H3N2)). Pobrano 30 próbek popłuczyn z nosa w 1, 3, 7 i 14 dni po wystąpieniu objawów grypopodobnych. Porównując wyniki badań przeprowadzonych techniką real-time PCR z krzywą wzorcową wykonaną na podstawie wyników amplifikacji kolejnych seryjnych rozcieńczeń szczyków wzorcowych oznaczanych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej, określano liczbę kopii wirusowego RNA w analizowanych próbkach. W przypadku real-time PCR u czterech pacjentów wykryto wirus grypy jeszcze 7 dnia po pojawieniu się objawów, podczas gdy hodowla w tym dniu była pozytywna tylko w jednym przypadku. Ponadto autorzy badając 98 próbek klinicznych w kierunku IV-A i IV-B wykazali, że czułość osiągnięta dzięki zastosowaniu metody real-time PCR wynosiła 66%, a dla hodowli wirusa jedynie 35%. W innych badaniach [46] real-time PCR zwiększył wykrywalność wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego z 24 na 43% w przypadku próbek pochodzących od dzieci i z 3,5 na 36% w przypadku próbek pobranych od dorosłych. Natomiast Wu i wsp. [53] analizując 189 materiałów klinicznych uzyskali 81 wyników dodatnich (42,9%) w PCR i jedynie 46 dodatnich (24,3%) w hodowli. Kuypers i wsp. [24] porównywali czułość metody IF z techniką real-time PCR przy wykrywaniu wirusa RS, IV-A, PIV-1, -2 i -3 oraz hAdV. Co najmniej jeden z tych wirusów został wykryty w 436 próbkach (38,3%) badanych metodą IF oraz w 550 próbkach (48,3%) badanych metodą PCR. Średnia liczba kopii wirusa w próbkach pozytywnych w obu badaniach była istotnie statystycznie wyższa ($6,7 \times 10^7$ kopi/ml) w porównaniu z próbkami pozytywnymi tylko w badaniu PCR ($4,1 \times 10^4$ kopi/ml) ($P < 0,001$). Przy zastosowaniu IF wykryto obecność wirusów tylko w 19% próbek (37 ze 194) z liczbą kopii wirusa $< 10^6$ /ml, ponadto z 52 próbek, które nie nadawały się do badania IF ze względu na niewielką liczbę komórek w pobranym materiale, 13 (25%) było

pozytywnych w badaniu PCR. Mentel i wsp. [31] badając 71 aspiratów z jamy nosowo-gardłowej pobranych od dzieci hospitalizowanych podczas epidemii wirusa RS wykazała, że metoda real-time PCR była o 25% czulsza niż *nested* PCR i aż o 60% bardziej czuła niż test ELISA.

Bredius i wsp. [4] wykazali zależność między wartością C_T , a wyjściowym stężeniem cząstek wirusa w materiale. Wszystkie próbki, dla których uzyskano wartość C_T równą 27–42 były ujemne w hodowli i DIF. W innych badaniach Templeton i wsp. [44] dla 67 próbek dodatnich w hodowli i real-time PCR dla IV-A, IV-B, RSV, PIV-1, -2, -3, -4, uzyskali średnią wartość C_T równą 26, natomiast dla 20 próbek ujemnych w hodowli a dodatnich w real-time PCR średnia wartość C_T była znacząco wyższa i wynosiła 37,5 ($P < 0,001$).

Obecnie w rutynowej diagnostyce wirusologicznej zakażeń dróg oddechowych znalazły zastosowanie także metody oparte na amplifikacji RNA, przede wszystkim NASBA (nucleic acid sequenced based amplification) [20,26]. W przeciwieństwie do PCR w NASBA matrycą jest RNA, a produktem amplifikacji jednoniciowe RNA o przeciwnym kierunku od wyjściowej matrycy. Reakcja jest izotermiczna i przebiega bez cyklicznych zmian temperatury (42°C). Ponadto jest znacznie bardziej złożona biochemicznie, wykorzystuje trzy różne enzymy: odwrotną transkryptazę (RT), RN-azę H i polimerazę RNA faga T7 oraz dwa rodzaje starterów, z których jeden zawiera na końcu 5' promotor rozpoznawany przez polimerazę RNA faga T7. Starter ten hybryduje z docelowym RNA, następnie za pomocą enzymu RT następuje przepisanie sekwencji na sekwencję cDNA. Z powstałej hybrydy RNA-cDNA, RNA jest hydrolizowany przez RN-azę H. W dalszym etapie reakcji do jednoniciowego cDNA przylączy się drugi starter, a enzym RT syntetyzuje komplementarną nić. Powstała w ten sposób cząsteczka dsDNA zawierająca promotor rozpoznawany przez polimerazę RNA faga T7 jest matrycą dla syntezy RNA.

PODSUMOWANIE

Trafna i szybka diagnostyka wirusowych zakażeń układu oddechowego umożliwia podjęcie właściwej decyzji o sposobie leczenia chorego, pozwala uniknąć nieuzasadnionej antybiotykoterapii i wdrożyć w odpowiednim czasie skuteczną terapię przeciwwirusową. Ma także ważny aspekt ekonomiczny, gdyż niejednokrotnie skraca czas pobytu pacjenta w szpitalu, obniża koszty leczenia i hospitalizacji, zapobiega szerzeniu się zakażeń w społeczeństwie, a także zakażeń szpitalnych.

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w diagnostyce wirusowych zakażeń układu oddechowego, co wiąże się przede wszystkim z wprowadzeniem i coraz częstszym wykorzystaniem metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych. Największą zaletą tych technik jest ich wysoka czułość i swoistość, znacznie wyższa w porównaniu z konwencjonalnymi metodami laboratoryjnymi. Należy jednak pamiętać, iż niezależnie od zastosowanej metody wiele czynników, takich jak okres od wystąpienia objawów choroby do pobrania materiału klinicznego czy sposób pobrania i przechowywania próbki do czasu analizy, ma fundamentalny wpływ na uzyskiwane wyniki. W przypadku

diagnostyki wirusowych zakażeń układu oddechowego największą wartość kliniczną mają próbki pobrane z miejsca zakażenia w czasie szczytu namnażania się wirusa. Wyniki badań powinny być zawsze analizowane i interpretowane w powiązaniu z różnymi informacjami, danymi

epidemiologicznymi i klinicznymi o pacjencie, czy wynikami dostępnymi z innych testów diagnostycznych. Zarówno zła jakość próbek, jak i źle dobrana metoda powodują iż ujemny wynik badania nie prowadziła na wykluczenie podejrzanego zakażenia wirusowego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agoritsas K., Mack K., Bonsu B.K., Goodman D., Salamon D., Marcon M.J.: Evaluation of the Quidel QuickVue Test for the detection of influenza A and B viruses in the pediatric emergency medicine setting by use of three specimen collection methods. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 2638–2641
- [2] Billaud G., Peny S., Legay V., Lina B., Valette M.: Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR. *J. Virol. Methods*, 2003; 108: 223–228
- [3] Borg I., Rohde G., Löseke S., Bittscheidt J., Schultze-Werninghaus G., Stephan V., Buße A.: Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 2003; 21: 944–951
- [4] Bredius R.G., Templeton K.E., Scheltinga S.A., Claas E.C., Kroes A.C., Vossen J.M.: Prospective study of respiratory viral infections in pediatric hemopoietic stem cell transplantation patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2004; 23: 518–522
- [5] 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
- [6] Brydak L.B.: Pandemia grypy, mit czy realne zagrożenie?. *Oficyna Wydawnicza Rytm, Warszawa* 2008
- [7] Brydak L.B., Machała M.: Inhibitory neuraminidazy wirusa grypy. *Przewodnik Lekarski*, 2001; 4: 55–60
- [8] Calvo C., García-García M.L., Blanco C., Vázquez M.C., Frías M.E., Pérez-Breña P., Casas I.: Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J. Clin. Virol.*, 2008; 42: 268–272
- [9] Caram L.B., Chen J., Taggart E.W., Hillyard D.R., She R., Polage C.R., Twersky J., Schmader K., Petti C.A., Woods C.W.: Respiratory syncytial virus outbreak in a long-term care facility detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction: an argument for real-time detection methods. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2009; 57: 482–485
- [10] Chang H.K., Park J.H., Song M.S., Oh T.K., Kim S.Y., Kim C.J., Kim H., Sung M.H., Han H.S., Hahn Y.S., Choi Y.K.: Development of multiplex rt-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008; 18: 1164–1169
- [11] Dagher H., Donninger H., Hutchinson P., Ghildyal R., Bardin P.: Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J. Virol. Methods*, 2004; 117: 113–121
- [12] Do A.H.L., van Doorn H.R., Nghiem M.N., Bryant J.E., Hoang T.H., Do Q.H., Van T.L., Tran T.T., Wills B., Nguyen V.C., Vo M.H., Vo C.K., Nguyen M.D., Farrar J., Tran T.H., de Jong M.D.: Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS One*, 2011; 6: e18176
- [13] Drews S.J., Blair J., Lombos E., DeLima C., Burton L., Mazzulli T., Low D.E.: Use of the Seeplex RV Detection Kit for surveillance of respiratory viral outbreaks in Toronto, Ontario, Canada. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2008; 38: 376–379
- [14] Fong C.K.Y., Lee M.K., Griffith B.P.: Evaluation of R-Mix fresh cells in shell vials for detection of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 4660–4662
- [15] Freymuth F., Eugene E., Vabret A., Petitjean J., Gennetay E., Brouard J., Duhamel J.F., Guillois B.: Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 3352–3355
- [16] George K.S., Patel N.M., Hartwig R.A., Scholl D.R., Jollick J.A., Kauffmann L.M., Evans M.R., Rinaldo C.R.: Rapid and sensitive detection of respiratory virus infections for direct antiviral treatment using R-Mix Cultures. *J. Clin. Virol.*, 2002; 24: 107–115
- [17] Grijalva C.G., Poehling K.A., Edwards K.M., Weinberg G.A., Staat M.A., Iwane M.K., Schaffner W., Griffin M.R.: Accuracy and interpretation of rapid influenza tests in children. *Pediatrics*, 2007; 119: e6–e11
- [18] Hierholzer J.C., Halonen P.E., Dahlen P.O., Bingham P.G., McDonough M.M.: Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31: 1886–1891
- [19] Huang Y.T., Turchek B.M.: Mink lung cells and mixed mink lung and A549 cells for rapid detection of influenza virus and other respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 422–423
- [20] Ieven M.: Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypical in acute respiratory infections. *J. Clin. Virol.*, 2007; 40: 259–276
- [21] Jones S.R.: Potential complications of influenza A infections. *West. J. Med.*, 1976; 125: 341–346
- [22] Kearney M.T., Cotton J.M., Richardson P.J., Shah A.M.: Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations and management. *Postgrad. Med. J.*, 2001; 77: 4–10
- [23] Kim S.R., Ki C.S., Lee N.Y.: Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods*, 2009; 156: 111–116
- [24] Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J., Huang M.L., Cent A., Corey L., Morrow R.: Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 2382–2388
- [25] Langford C.: The age pattern of mortality in the 1918–19 influenza pandemic: an attempted explanation based on data for England and Wales. *Med. Hist.*, 2002; 46: 1–20
- [26] Lau L.T., Feng X.Y., Lam T.Y., Hui H.K., Yu A.C.: Development of multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of human respiratory tract viruses. *J. Virol. Methods*, 2010; 168: 251–254
- [27] Lee J.H., Chun J.K., Kim D.S., Park Y., Choi J.R., Kim H.S.: Identification of adenovirus, influenza virus, parainfluenza virus, and respiratory syncytial virus by two kinds of multiplex polymerase chain reaction (PCR) and shell vial culture in pediatric patients with viral pneumonia. *Yonsei Med. J.*, 2010; 51: 761–767
- [28] Liao R.S., Tomalty L.L., Majury A., Zoutman D.E.: Comparison of viral isolation and multiplex real-time reverse transcription-PCR for confirmation of respiratory syncytial virus and influenza virus detection by antigen immunoassays. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 527–532
- [29] Mahony J.B.: Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008; 21: 716–747
- [30] Meerhoff T.J., Houben M.L., Coenjaerts F.E., Kimpen J.L., Hofland R.W., Schellevis F., Bont L.J.: Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010; 29: 365–371
- [31] Mentel R., Wegner U., Bruns R., Gürtler L.: Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Microbiol.*, 2003; 52: 893–896
- [32] Molenkamp R., van der Ham A., Schinkel J., Beld M.: Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: application in viral molecular diagnostics. *J. Virol. Methods*, 2007; 141: 205–211
- [33] Murray C.J., Lopez A.D., Mathers C.D., Stein C.: The Global Burden of Disease 2000 project: aims, methods and data sources. *Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion Paper no. 36*. <http://www.who.int/healthinfo/paper36.pdf> (14.10.2011)
- [34] Nakamura S., Katamine S., Yamamoto T., Fong S.K., Kurata T., Hirabayashi Y., Shimada K., Hino S., Miyamoto T.: Amplification and detection of a single molecule of human immunodeficiency virus RNA. *Virus Genes*, 1993; 7: 325–338
- [35] Nascimento M., Souza A.V., Ferreira A.V., Rodrigues J.C., Abramovici S., Silva Filho L.V.: High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (São Paulo)*, 2010; 65: 1133–1137
- [36] 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

- [37] Richard N., Komurian-Pradel F., Javouhey E., Perret M., Rajoharison A., Bagnaud A., Billaud G., Vernet G., Lina B., Floret D., Paranhos-Baccalà G.: The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2008; 27: 213–217
- [38] Roh K.H., Kim J., Nam M.H., Yoon S., Lee C.K., Lee K., Yoo Y., Kim M.J., Cho Y.: Comparison of the seplex reverse transcription PCR assay with the R-mix viral culture and immunofluorescence techniques for detection of eight respiratory viruses. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2008; 38: 41–46
- [39] Rola A., Przybylski M., Dzieciatkowski T., Turowska A., Łuczak M.: Zastosowanie metody real-time PCR z zastosowaniem sond TaqMan do wykrywania zakażeń adenowirusami człowieka. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2007; 59: 371–377
- [40] Rynans S., Dzieciatkowski T., Krenke R., Grabczak M., Kołkowska-Leśniak A., Przybylski M., Sulowska A., Chazan R., Warzocha K., Młynarczyk G.: Wykorzystanie ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym do wykrywania zakażeń dolnych dróg oddechowych wywołanych adenowirusami u osób z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego. *Przegl. Epidemiol.*, 2011; 65: 333–338
- [41] Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L.: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40: 3256–3260
- [42] Stauffer F., Haber H., Rieger A., Mutschlechner R., Hasenberger P., Tevere V.J., Young K.K.: Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle Mycobacterium-specific PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 614–617
- [43] Stefańska I., Romanowska M., Donevski S., Nowak I., Brydak L.B.: Molecular detection of influenza during pandemic A/H1N1/v in Poland. Konferencja naukowa: Options for the Control of Influenza VII, 3–7.09. 2010, Hong Kong SAR, Chiny
- [44] Templeton K.E., Scheltinga S.A., Beersma M.F., Kroes A.C., Claas E.C.: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 1564–1569
- [45] Uyeki T.M., Prasad R., Vukotich C., Stebbins S., Rinaldo C.R., Ferng Y., Morse S.S., Larson E.L., Aiello A.E., Davis B., Monto A.S.: Low sensitivity of rapid diagnostic test for influenza. *Clin. Infect. Dis.*, 2009; 48: e89–e92
- [46] van de Pol A.C., van Loon A.M., Wolfs T.F., Jansen N.J., Nijhuis M., Breteler E.K., Schuurman R., Rossen J.W.: Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 2260–2262
- [47] van den Hoogen B.G., van Doornum G.J., Fockens J.C., Cornelissen J.J., Beyer W.E., de Groot R., Osterhaus A.D., Fouchier R.A.: Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J. Infect. Dis.*, 2003; 188: 1571–1577
- [48] van Elden L.J., Nijhuis M., Schipper P., Schuurman R., Loon A.M.: Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 196–200
- [49] Whiley D.M., Syrmis M.W., Mackay I.M., Sloots T.P.: Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by LightCycler Reverse Transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40: 4418–4422
- [50] WHO: Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2011. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20111129CumulativeNumberH5N1cases.pdf (12.12.2011)
- [51] WHO: Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html (12.12.2011)
- [52] WHO: WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans – revised. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf (12.12.2011)
- [53] Wu C., Cheng X., He J., Lv X., Wang J., Deng R., Long Q., Wang X.: A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza viruses A and B and subtypes H5 and N1. *J. Virol. Methods*, 2008, 148: 81–88
- [54] Xepapadaki P., Psarras S., Bossios A., Tsolia M., Gourgiotis D., Liapi-Adamidou G., Constantopoulos A.G., Kafetzis D., Papadopoulos N.G.: Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J. Clin. Virol.*, 2004; 30: 267–270

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.