Laboratorijske ugotovitve

Gert van Zyl

Prevod: Marko Kovačević

Uvod

Od prvega opisa virusa gripe l. 1933 so razvili različne diagnostične načine (Webster 1998). Te diagnostične tehnike je možno uporabiti za potrditev klinične diagnoze. V poglavju se razpravlja o najbolj pomembnih testih tako o njihovih prednostih kot pomanjkljivostih. Vendar ima tudi najboljši diagnostični test majhno vrednost brez kvalitetnega odvzema vzorca in brez natančne informacije o pacientu.

Laboratorijska diagnoza humane gripe

Ustrezni odvzem vzorca

Vzorci iz dihal

Časovna usklajenost odvzema vzorca je zelo pomembna, vzorci iz dihal so koristni le, če se jih vzame znotraj 4 dneh od pojava simptomov. Možno je vzeti različne vrste vzorcev iz dihal. Izpirek iz nosu in aspirat iz nazofarinksa kažejo boljšo občutljivost kot brisi žrela. Pri pacientih, ki so intubirani, je možno vzeti aspirat traheje in izpirek iz bronha (WHO 2005a). Za teste imunofluorescence morajo izpirki in aspirati vsebovati zadostno količino respiratornega epitela. Vzorci brez zadostne količine celic so še vedno primerni za druge metode, kot je hitra detekcija antigena, izolacija virusa in za reakcijo reverzne transkripcije polimeraze (RT-PCR).

Da se prepreči sušenje, se brise transportira v transportnem gojišču za viruse.

Zaradi preprečitve degradacije je treba vse vrste vzorcev čim prej poslati v laboratorij. Če se pričakuje zamuda v transportiranju, je potrebno dati transportno gojišče za viruse na led ali pa v hladilnik na temperaturo 2 - 8°C.

Vzorci krvi

Vzorci krvi (polna kri, serum) so potrebni za serologijo protiteles (določanje prisotnosti protiteles proti gripi). Za dokazovanje signifikantnega (najmanj štirikratnega) porasta specifičnih protiteles, se odvzame vzorec seruma v akutni fazi bolezni in serum v fazi rekonvalescence, v razmaku od 14 – 21 dni.

Klinična vloga in korist laboratorijske diagnoze

Ravnanje s pacientom

Hitra diagnoza je pomembna, če imamo namen pričeti z zgodnjim zdravljenjem z dragimi protivirusnimi zdravili. Da bi bila zdravila učinkovita, jih je treba začeti dajati znotraj 48 ur od pojava simptomov (WHO 2005a). Kandidati za zgodnje zdravljenje so pacienti z obstoječimi obolenji in pacienti s povečanim tveganjem za nastanek resnih komplikacij (glej poglavje "Klinična slika"). Diagnoza gripe pri starejših pacientih kaže na znatno nevarnost tveganja za nastanek sekundarnih bakterijskih okužb s *Staphylococcus aureusom*, *Haemophilus influenzae* in s *Streptococcus pneumoniae*.

Poleg tega imajo hitri testi na virus gripe vlogo v obvladovanju bolnišničnih okužb za zmanjšanje širjenja okužbe s pacienta na pacienta ali pa z okuženega zdravstvenega osebja na paciente, ki so v visokem tveganju. Teste je možno uporabiti tudi za diagnosticiranje gripe pri potnikih- v pol zaprtih skupnostih, kot so pri križarjenja ali v epidemijah (WHO 2005a).

Končna diagnoza gripe ime prognostično vrednost pri zdravih mladih osebah, pri katerih ima bolezen kratek in benigen potek.

Nadzor

Pri izvajanju sentinel- nadzora gripe, se uporabljajo različni testi in kaže, da v evropski regiji ni nobene standardizacije glede njihove uporabe (Meerhoff 2004). Različne diagnostične tehnike imajo svoje prednosti in pomanjkljivosti. Zaradi tega se za potrebe nadzora uporablja različne teste. Hitre direktne tehnike kot je RT-PCR (Bigl 2002) ali EIA omogočajo hitro detekcijo epidemije in jih je dobro uporabljati za ločevanje med gripo A ali B. Izolacija virusa v embrioniranih kokošjih jajcih ali v kulturi celic se uporablja zaradi subtipizacije virusov.Za natančno določanje hemaglutininskega in nevraminidaznega podtipa se uporablja reakcija inhibicije hemaglutinacije in RT-PCR. Sekvencioniranje PCR produktov se uporablja za določanje molekularne epidemiologije virusov, ki krožijo. To, skupaj s titri inhibicije hemaglitinacije med titri, omogoča SZO, da priporoča ustrezno cepivo, ki bo z največjo verjetnostjo ščitilo pred sevi virusov, ki so v cirkulaciji. Nadzor je pomemben tudi za določanje javno zdravstvenih ukrepov, kajti zdravstvene posledice posameznih epidemij in deleži cost-benefit posameznih intervencij, kot je cepljenje, lahko motivirajo osebe, ki odločajo o prioriteti preprečevanja gripe.

Laboratorijski testi

Pri odločanju o tem katere teste uporabiti je treba pretehtati številne dejavnike. Pri tem je treba vzeti v obzir občutljivost, specifičnost, čas obračanja, ponovljivost, lahkotnost izvajanja in ceno testa. RT-PCR je splošno bolj občutljiv, kot je serologija in izolacija, toda kombinacija RT-PCR s serologijo, je bolj občutljiva kot kombinacija katerihkoli drugih dveh metod (Zambon 2001). Občutljivost izolacije je v veliki meri odvisna od laboratorija, v katerem se jo izvaja. Serologija kaže tendenco nižjih stroškov kot RT-PCR, toda zanjo je potrebno imeti akutni in rekonvalescenčni serum, tako da je diagnoza retrospektivna, pozna. Tradicionalni postopek izolacije zahteva čas, toda tehnike shell vial izolacije omogočajo diagnozo v 48-72 urah.

Direktne metode

Obstajajo različne metode za detekcijo virusov gripe. Nekatere od njih, kot je encimska tehnika (EIA), so lahko ustrezne za testiranje v bolnišničnih pogojih, druge, kot je direktna imunofluorescenca, omogočajo pripravljanje rezin in pošiljanje fiksiranih rezin v centralni laboratorij (Allwinn 2002). RT-PCR je možno izvesti edino v dobro opremljenem laboratoriju in z izurjenim osebjem. S temi metodami je možna detekcija gripe A in gripe B, kot tudi razločevanje tipov (gripa A ali B). Edina direktna tehnika, ki ima potencial za razločevanje podtipov (to je na osnovi hemaglutinina in nevraminidaze) je RT-PCR.

Imunofluorescenca

Za direktno imunofluorescenco je potrebno potencialno okužene respiratorne epitelne celice fiksirati na rezini. Virusne antigene, ki so vsebovani v celici odkrijemo s pomočjo specifičnih protiteles, ki so lahko direktno vezana na fluorescentno barvo (direktna imunofluorescenca) ali pa jih odkrijemo s pomočjo protiprotiteles vezanih na fluorescentno barvo (indirektna imunofluorescenca). V obeh primerih je to vidno s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, pozitivne celice se razlikujejo po intenziteti barve in po morfologiji fluorescenčnih delov. Direktna imunofluorescenca omogoča, da so rezultati hitrejši, toda na splošno je manj občutljiva kot indirektna imunofluorescenca. Indirektna imunofluorescenca ima prednosti tudi v

tem, ker je možno uporabiti pulirane (seruma zbranega od več oseb) antiserume za ugotavljanje virusne okužbe s pomočjo enega protiprotitelesa vezanega na fluorescentno barvo (običajno se uporablja s fluorescein izotiocianatom-konjugirana protiprotitelesa miši,; Stevens 1969). Imunofluorescenca omogoča hitro diagnozo vzorcev vzetih iz dihal, če je v vzorcu prisotno zadostno število epitelnih celic. Toda obstaja interindividualno variiranje pri poročanju izvida testa imunofluorescence, kajti interpretacija je subjektivna in je preciznost odvisna od sposobnosti in od izkušenosti izvajalca testa.

Encimski imunski testi ali imunokromatografski testi

Pri encimskih imunskih testih (EIA) se uporablja protitelesa proti virusnemu antigenu, ki so združena-vezana za encim. V reakciji se inubira kromogeni substrat encima, sledi sprememba barve, ki kaže na prisotnost virusnega antigena. Določene imunske encimske teste je možno uporabiti ob postelji pacienta, enako kot nekatere imunokromatografske teste (Allwinn 2002) in trajajo od 10-30 minut. Ti hitri testi so splošno veliko dražji kot je direktna imunofluorescenca ali pa izolacija virusa. Občutljivost testov EIA se giblje od 64% do 78% (Allwinn 2002). Različni hitri testi lahko odkrijejo virus gripe, ne da ločijo med tipom A ali B virusa. Določajo samo virus gripe A ali pa virus A in B, ne da identificirajo tip virusa. Toda nobeden od teh hitrih testov ne more razlikovati podtipov, ki okužijo ljudi (H1N1 and H3N2) ali pa podtip ptičje gripe (FDA, 2005). Seznam hitrih testov, ki so na tržišču je možno dobiti na naslovu: http://www.cdc.gov/flu/professionals/labdiagnosis.htm.

Reakcija transkripcije verige polimeraze (RT-PCR)

RT-PCR je postopek s katerim se RNA najprej spremeni v komplementarno DNA (cDNA) in se odrezek genoma nato veča (po količini) s pomočjo primer, ki se specifično vežejo na to ciljno mesto. S tem je omogočeno eksponencialno večanje majhnih količin nukleinskih kislin skozi delovanje termo stabilnega encima DNA polimeraze, kar omogoča detekcijo velike občutljivosti že minimalnih količin virusnega genoma.

Poleg visoke občutljivosti RT-PCR (Steininger 2002) omogoča diferenciranje podtipov in izvajanje filogenične analize (Allwinn 2002). Senzitivnost RT-PCR lahko zmanjša prisotnost degradiranih delcev RNA iz prejšnjih vzorcev (Frisbie 2004). Zaradi tega je potrebno vzorce dati v analitično obdelavo čim prej po vzorčenju.

Metode izolacije

Izolacija virusa ali kultivacija je tehnika, pri kateri se vzorec inokulira v živi sistem kulture in nato v tem sistemu odkriva prisotnost okužbe z virusom. Ker kultura povečuje količino virusa, je zaradi tega bolj senzitivna metoda, kot so to direktne metode, z izjemo RT-PCR (ki tudi uporablja povečanje). Izolacija virusa je koristna edino, če gre za živ sistem ali so celice občutljive na virus, katerega se ima namen izolirati.

Za izolacijo je potrebno hitro transportiranje vzorcev v laboratorij, kajti zamuda lahko povzroči inaktivacijo virusa (Allwinn 2002).

Kultura embrioniranih jajc

Vzorec se vcepi v amnionsko votlino embrioniranih kokošjih jajc starih 10-12 dni. Visoki obrodek je možno dobiti po 3 dnevni inkubaciji (WHO 2005d).

Ta tehnika zahteva nabavo oplojenih kokošjih jajc in posebne inkubatorje in se je v rutinski diagnostiki gripe ne uporablja več. Vendar izolacija na jajcih omogoča pridobitev velike količine virusa in to je zelo občutljiv sistem kultur. Referenčni laboratoriji zaradi tega uporabljajo ta

sistem za kultiviranje, da bi zagotovile visoko senzitivnost in bi bile zmožne proizvajanja velikih zalog virusov za potrebe epidemiološkega monitoringa.

Kulture celic

Konvencionalne kulture: Za izolacijo virusov gripe so v uporabi različne linije celic, večina jih je sestavljena iz primarnih celic ledvic opic ter Madin-Darby celice pasjih ledvic (MDCK). Nekateri avtorji priporočajo uporabo tripsina, ki pomaga vstop virusa v linije celic (WHO 2005d). Izolacija na konvencionalnih kulturah celic traja do 2 tedna, vendar ima visoko občutljivost. V celicah je viden citopatogeni učinek, kot so sincicijska in intracitoplazemska bazofilna inkluzijska telesca. Prisotnost virusa gripe se preveri s hemadsorpcijo na rdečih krvničkah morskega prašička (Weinberg 2005) ali z imunofluorescenco na celicah kulture. Imunofluorescenco na celicah kulture se uporablja za tipiziranje izoliranega virusa. Imunofluorescenca pozitivnih kultur je bolj občutljiva za detekcijo, kot je to hemadsorpcija.

Shell vial kultura: Shell vial kultura omogoča diagnozo v 48 urah (Allwinn 2002). To se doseže s centrifugiranjem inokuluma na enoslojno kulturo celic in z izvajanjem imunofluorescence, predno je opazen citopatogeni učinek. Shell vial kultura je manj občutljiva, kot je konvencionalna kultivacija (Weinberg 2005).

Laboratorijske živali

V raziskovalnih inštitucijah pogosto uporabljajo belega dihurja za model okužbe z virusi humane gripe, vendar nimajo nobene vloge v rutinski diagnostiki.

Serologija

Serologija se nanaša na detekcijo specifičnih protiteles proti virusu gripe v serumu (ali v telesnih tekočinah).

S serologijo je možno odkriti skupna protitelesa ali pa za gripo specifična protitelesa (IgG, IgA, ali IgM).

Za diagnostiko gripe obstajajo različni serološki testi: inhibicija hemaglutinacije (HI), fiksacija komplementa (CF), encimski testi (EIA) in indirektna imunofluorescenca.

Za diagnosticiranje akutne gripe ima serologija zelo majhno diagnostično vrednost. Da bi diagnosticirali akutno okužbo je potrebno dokazati najmanj 4 kratni porast titrov protiteles. Za to je potrebno imeti 2 vzorca seruma iz akutne faze bolezni in iz faze rekonvalescence. Vendar ima lahko to vrednost pri diagnosticiranju nedavno okuženih bolnikov.

Serologijo se uporablja za ugotavljanje odgovora na cepljenje proti gripi (Prince 2003).

Serologija ima veliko klinično vrednost pri pediatričnih pacientih, ki prej niso bili eksponirani gripi, kajti prejšnja ekspozicija lahko povzroči odgovor z hetrolognimi protitelesi (Steininger 2002).

Inhibicija hemaglutinacije (HI)

HI tehnika je zamudna in zahteva čas za izvedbo, potrebno je več kontrol zaradi standardiziranja. Vendar so reagenti poceni in so povsod dostopni. Lahko se uporabi rdeče krvničke morskega prašička, perutnine ali človeka krvne skupine "O". Za reakcijo se uporabi 0.4– 0.5% razredčenje rdečih krvničk. Serum se najprej obdela tako, da se iz njega odstrani nespecifične hemaglutinine in inhibitorje. Nato se prej inkubira pripravek virusnega

hemaglutinina, ki povzroča vidno hemaglutinacijo (običajno 4 hemaglutinacijeske enote) z dvakratno razredčenim vzorcem seruma. HI titer je titer, ki je vsebovan v najnižjem razredčenju seruma, ki še kaže inhibicijo hemaglutinacije. HI je bolj občutljiva kot je fiksacija komplementa (Julkunen 1985, Prince 2003), poleg tega je njena prednost v tem, da je bolj specifična pri razločevanju med HA podtipi (Julkunen 1985).

Fiksacija komplementa (CF)

Testi fiksacije komplementa temeljijo na zmožnosti kompleksov antigen-protitelo, da porabijo komplement – kar povzroča pomanjkanje komplementa, ki bi liziral senzibilizirane ovčje eritrocite. Ti testi so zamudni in je pri njih nujno izvajati kontrole pri vsakem postopku, toda reagenti so poceni in povsod dostopni. CF test je manj senzitiven kot HI za diagnostiko akutne okužbe, kot tudi za ugotavljanje imunitete po cepljenju (Prince 2003)

Encimski testi (EIA)

EIA testi so bolj občutljivi kot sta HI ali CF tehnike (Bishai 1978, Julkunen 1985). Na razpolago so različni komercialni testi EIA. Testi s katerimi se ugotavlja IgG in IgA so bolj občutljivi kot testi za ugotavljanje IgM (Julkunen 1985), toda niso kazalni za akutno okužbo.

Indirektna imunofluorescenca

Indirektna imunofluorescenca ni navadno v uporabi kot metoda za detekcijo protiteles proti gripi.

Hitri testi

Klinična vrednost diagnostičnega testa na gripo je v veliki meri odvisna od časa potrebnega za izvedbo testa. Prvi diagnostični testi, ki so nastali za potrebe diagnosticiranja gripe, so bili izolacija virusa in serološki testi. V tej fazi je bilo potrebno več kot 2 tedna, da se izključi okužba za gripo. Čeprav so shell vial testi zmanjšali čas, ki je potreben za izolacijo, to niso testi, ki so uvrščeni med hitre teste.

Razvoj direktnih testov kot je imunofluorescenca je omogočil postavitev diagnoze v nekaj urah (1 do 2 inkubaciji in postopka izpiranj). Za izvajanje testov imunofluorescence je potrebno imeti izkušene laboratorijske delavce in imunofluorescentni mikroskop.

Revolucijo v hitri diagnozi gripe je povzročil razvoj hitrih testov za antigene (večina jih deluje na principu EIA ali na principu imunokromatografije). Te tehnike omogočajo postavitev diagnoze gripe v teku 10-30 minut. Nekateri od njih so zelo enostavni, da jih na oddelkih lahko izvaja celo ne laboratorijsko osebje, temu rečemo testiranje ob postelji ali na mestu oskrbe.

RT-PCR reakcije za katere je potrebno izvajanje gel elektroforeze, so bili v začetku zelo zamudni in počasni. Z nedavno uporabo t.i. real time tehnologije je možno RT-PCR diagnostični test izvesti v približno 2 urah. Čeprav so antigenske tehnike splošno najbolj prijazne do uporabnika, je njihova pomanjkljivost, da niso občutljive, kot je to direktna imunofluorescenca, izolacija ali pa RT-PCR.

Tabela 1 primerjava značilnosti različnih testov za diagnostiko gripe.

Tabela 1: Primerjava značilnosti testov *				
Test	Občutljivost	Čas potreben za izvedbo	Lahkota izvedbe	Dostopnost
Direktnat detekcija				
Hitri testi (EIA / kromatografija)	-2	+2	+2	0
Imunofluorescenca	0	+1	+1	+1
Gel elektroforeza RT-PCR	+2	0	-1	-2
Real-time RT-PCR	+2	+1	-1	-2
Kultivacija virusa				
Rutinska kultivacija virusa	+2	-2	-1	+2
Shell vial kultura	+1	0	-1	+1
Serologija				
EIA	+2	-2	+1	+1
Inhibicija hemaglutinacije	+1	-2	-1	+2
Fisiranje komplementa	0	-2	-2	+2

*Relativni kriterij za ugodnost testov (5 točk ordinalne skale)
-2: telo neugodna značilnost
-1: neugodna značilnost
0: povprečna značilnost
+1: ugodna značilnost
+2: zelo ugodna značilnost

Diferencialna diagnoza gripi podobnih obolenj

Kot gripi podobni so opisani številni različni simptomi: vročina, kašelj, zamašen nos, glavobol, slabo počutje in bolečine v mišicah. Vendar ni jasne definicije niti enotnosti pri uporabi termina "gripi podoben ".

Tekom epidemije so klinični znaki vročina, kašelj, težki simptomi s strani nosu in izguba apetita visoko prediktivni za gripo (Zambon 2001). Toda številne druge okužbe imajo lahko simptome podobne gripi. To so lahko okužbe povzročene z virusi, bakterijami, mikoplazmo, klamidijami in z glivicami kot tudi infestacije s paraziti. S simptomi, ki so podobni gripi, se lahko pojavijo okužbe, ki so lahko življenjsko nevarne pri mladih in zdravih osebah, kot so virusne hemoragične mrzlice ali pa okužbe kot je legioneloza, ki so življenjsko nevarne v tveganih skupinah starejših oseb. Zaradi tega je pomembno zajeti široko diferencialno diagnostiko,

upoštevati anamnezo glede potovanja, poklicne izpostavljenosti, stika z živalmi in z obolelimi osebami, zaporedje simptomov kot tudi lokalno epidemiologijo bolezni.

Diagnoza suma okužbe človeka s ptičjim virusom

Uvod

Največji pomen za začetek zdravljenja in nadaljevanje dajanja ustreznih zdravil ter za obvladovanje okužbe pri sumljivih primerih na okužbo s H5N1 ima natančno in hitro razjasnjevanje s pomočjo laboratorijske diagnostike. Izolacijo virusa iz vzorcev na ptičjo gripo sumljivih primerov mora izvajati specializirani referenčni laboratorij, ki mora imeti opremo za najmanj 3. nivo biovarnosti (Biosafety Level 3).

Odvzem vzorcev

Vzorce za detekcijo ali za izolacijo virusa je treba odvzeti znotraj 3 dni od pojava simptomov in jih hitro transportirati v laboratorij. Za diagnosticiranje je možno odvzeti vzorce kot so aspirat iz nazofariksa, bris nosu, izpirek nosu, bris nazofarinksa ali bris žrela. Toda aspirat iz nosu je najboljši vzorec. V primerih, kadar je pacient intubiran, je možno odvzeti transtrahealni aspirat ali bronhoalveolarni izpirek.

Sočasno se odvzame vzorec krvi (akutni serum) in se načrtuje odvzem rekonvalescenčnega seruma, kar se uporabi za serološko diagnostiko (WHO 2005b).

Načini virološke diagnostike

Možno je uporabiti hitro identifikacijo kužnega agensa, kot je virus gripe A, s pomočjo običajnih hitrih testov za gripo, ki ločijo tipe virusov. Toda komercilani hitri kromatografski testi imajo le 70% občutljivost za ptičjo gripo v primerjavi z izolacijo (Yuen 2005). Direktno diagnozo gripe povzročene s H5N1 je možno izvesti s pomočjo indirektne imunofluorescence na respiratornih celicah, ki so fiksirane na steklene ploščice. Uporabi se kombinacijo pula specifičnih monoklonskih protiteles za tip gripe A/H5, pul specifičnih monoklonskih protiteles za tip A in za tip B, kot tudi specifična monoklonska protitelesa A/H1 in A/H3 (na razpolago pri SZO) in proti mišja FITC za detekcijske korake. Ta tehnika omogoča hitro diferenciranje okužbe s humano H5 gripo od ostalih tipov in podtipov gripe, toda zaradi slabe občutljivosti ne more izključiti okužbe s H5N1. Zaradi tega sta izolacija in/ali RT-PCR bolj občutljivi in ju je treba tudi uporabljati.

Za izolacijo virusa je možno uporabiti embrionirana kokošja jajca, celice pasje ledvice Madin Darby (MDCK) ali pa celice ledvice Rhesus opice (LLC-MK2) (de Jong 2005, Yuen 2005). Za virus ptičje gripe A/H5 je dovoljeno uporabljati tudi druge celice kot so Hep-2 ali RD celice. Citopatološki učinki so nespecifični in okužbo celic z virusom gripe A je potrebno ugotoviti s pomočjo imunofluorescence za nukleoprotein. Za subtipizacijo teh virusov je možno uporabiti HI supernatanta kulture celic, imunofuorescenco specifično za H5 (s pomočjo monoklonskih protiteles proti H5) ali pa RT-PCR. Obstaja masa za detekcijo H5 in N1 genov ptičje gripe s pomočjo RT-PCR (WHO 2005c). Obstaja specifična masa za H9 (WHO 2005c)

Detekcija gripe A/H5 s pomočjo real-time RT-PCR je hitra in visoko občutljiva metoda za diagnostiko okužbe s H5N1 (Ng 2005).

Serologija: Pri ozdravelih pacientih je diagnostičen 4 kratni porast titrov med akutnim in rekonvalescenčnim serumom (Yuen 2005).

Ostale laboratorijske ugotovitve

Običajno je, da pri zbolelih obstaja leukopenija in posebej limfopenija (kar se je pokazalo kot znak za slabo prognozo pri zbolelih na Tajskem), trombocitopenija in zmerno povečane transaminaze (Beigel 2005).

Novi dogodki in bodočnost na področju diagnostike gripe

Ugotovljeno je le malo trendov na področju diagnostike gripe. Dostopnost zdravil proti gripi, ki jih je treba začeti dajati že pri zgodnji okužbi, da bi bila učinkovita, je poudarila potrebo za zgodnjo diagnostiko, ki jo je spodbudil razvoj številnih EIA ali imunokromotografskih testov, ki so zelo enostavni za izvajanje. Vendarle je vrednost teh testov omejena zaradi nizke občutljivosti, posebej za diagnostiko ptičje gripe.

Real-time RT-PCR nudi visoko občutljivo in specifično možnost diagnostike. Tehnološki razvoj je prispeval, da je real-time RT-PCR bolj dostopen, kajti inštrumenti so postali manjši, bolj učinkoviti in bolj prijazni za porabnika. Zaradi tega je ta tehnika že pridobila pomembnost v načrtih priprav za pandemijo, kajti laboratorijem nudi možnost občutljive in specifične diagnostike pri primerih humane gripe. Edina ovira za uporabo je relativno visoka cena, toda konkurenca na trgu je omogočila boljšo dostopnost teh testov.

Zaključek

Na področju laboratorijske diagnostike gripe imajo tehnike molekularne diagnostike vse večji pomen. Direktni hitri testi so že postali zelo pomembno orodje za raziskovanje gripi podobnih obolenj.

Toda izolacija virusa vendarle ostaja pomembna posebej za referenčne laboratorije, ker je poceni, je občutljiva in omogoča karakteriziranje virusov. Poleg tega, za razliko od molekularnih testov, je visoko natančna in se z njo odkrije nepričakovane nove seve.

Glavna vrednost serologije gripe je za namene epidemiološkega raziskovanja sezonskih epidemij, prenosa s ptic na človeka in preizkusov zdravil in preizkusov cepiv. Ima zelo majhno vrednost za rutinsko diagnosticiranje.

Lahko zaključimo, da ima virološka diagnostika gripe pomen za posameznega pacienta, za epidemiološko raziskovanje in za obvladovanje okužbe. Na izbiro posameznega testa, ki bo uporabljen, vplivajo značilnosti testa in potrebe po specifičnosti diagnostike kot tudi preventivno medicinske potrebe.

Pozitivni diagnostični test loči osebo z gripi podobnim obolenjem in osebo z definitivno diagnozo gripe, ali pa loči zbolelega, ki je sumljiv na ptičjo gripo in zbolelega, pri katerem je potrjen primer ptičje gripe.

Koristni viri na internetu za diagnostiko gripe

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm

http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.html

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/print.html

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf

http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf

Literatura

1. Allwinn R, Preiser W, Rabenau H, Buxbaum S, Sturmer M, Doerr HW. Laboratory diagnosis of influenza--virology or serology? Med Microbiol Immunol (Berl) 2002; 191: 157-60. Epub 2002 Aug 30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12458351
2. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482
3. Bigl S, Briem I, Drechsler R, Kluge D, Muller L, Nowotnik G. Acute respiratory diseases/influenza sentinel 2000/2001. Med Microbiol Immunol (Berl) 2002; 191: 151-6. Epub 2002 Sep 14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12458350
4. Bishai FR, Galli R. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. J Clin Microbiol 1978; 8: 648-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=217892
5. de Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). J Clin Virol 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16213784
6. FDA: Cautions in Using Rapid Tests for Detecting Influenza A Viruses. US Food and Drug Administration: Office of In Vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety, 2005. (Accessed December 15 2005 at http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.ht ml
7. Frisbie B, Tang YW, Griffin M, et al. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best diagnostic method to use for archival samples? J Clin Microbiol 2004; 42: 1181-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15004072
8. Julkunen I, Pyhala R, Hovi T. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. J Virol Methods 1985; 10: 75-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3882733
9. Meerhoff TJ, Paget WJ, Aguilera JF, van der Velden J. Harmonising the virological surveillance of influenza in Europe: results of an 18-country survey. Virus Res 2004; 103: 31-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163485
10. Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL, Lim WW. Influenza A H5N1 detection. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1303-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102326
11. Prince HE, Leber AL. Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 481-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12738654
12. Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. J Clin Microbiol 2002; 40: 2051-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12037063
13. Stevens TD, Watkins HM. Rapid identification of viruses by indirect immunofluorescence: standardization and use of antiserum pool to nine respiratory viruses. Appl Microbiol 1969; 17: 384-93. http://amedeo.com/lit.php?id=4305395
14. Webster RG. Influenza: an emerging disease. Emerg Infect Dis 1998; 4: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9716966
15. Weinberg A, Mettenbrink CJ, Ye D, Yang CF. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. J Clin Virol 2005; 33: 172-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15911434
16. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Geneva: World Health Organisation, 2005. (Accessed November 25, 2005, at http://w ww.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf)
17. WHO guidelines for the collection of human specimens for laboratory diagnosis of avian influenza infection. Geneva: World Health Organisation, 2005. (Accessed November 26,

2005 at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/humanspecimens/en/print.html)
18. Recommended laboratory tests to indentify avian influenza A virus in specimens from humans. Genvea: World Health Organisation, 2005 (Accessed November 26, 2005 at http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/avian_labtests2.pdf)
19. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Geneva: World Health Organisation, 2005 (Accessed November 28, 2005 at http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrncs20025rev.pdf)
20. Yuen KY, Wong SS. Human infection by avian influenza A H5N1. Hong Kong Med J 2005; 11: 189-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15951584
21. Zambon M, Hays J, Webster A, Newman R, Keene O. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. Arch Intern Med 2001; 161: 2116-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11570941