

Laboratorijski nalazi

[Gert van Zyl](#)

Prevod: Dimitrije Ponomarev

Uvod

Otkako je virus influence prvi put opisan 1933. godine, razrađeni su različiti dijagnostički modaliteti (Webster 1998). Ove dijagnostičke tehnike koriste se radi potvrde kliničke dijagnoze. U ovom poglavlju će se prodiskutovati uloga najvažnijih testova, kao i njihove prednosti i ograničenja. Međutim, i najbolji dijagnostički test ima malu vrednost bez odgovarajućeg sakupljanja kvalitetnih uzoraka i preciznih informacija o pacijentu.

Laboratorijska dijagnostika influence kod ljudi

Odgovarajuće prikupljanje uzoraka

Uzorci iz respiratornog trakta

Blagovremeno prikupljanje uzoraka veoma je važno pošto je uspeh dijagnostike najviši kod respiratornih uzoraka dobijenih u prva četiri dana od pojave simptoma. Mogu se koristiti različite vrste respiratornih uzoraka. Ispirci nosa i aspirati iz nazofarinksa imaju veću senzitivnost nego brisevi farinksa. U intubiranih pacijenata, mogu se koristiti trahealni aspirati i lavati bronha (WHO 2005a). Ispirci i aspirati treba da sadrže dovoljno respiratornog epitela za testove imunofluorescencije. Uzorci bez dovoljno ćelija, međutim, ipak su podesni za druge metode kao što je brza detekcija antigena, izolacija virusa i polimerazna lančana reakcija reverznom transkripcijom polimeraze [reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR)].

Briseve treba transportovati u podlozi za transport virusa (virusnoj transportnoj podlozi), da bi se izbeglo njihovo isušivanje.

Svi uzorci treba da stignu u laboratoriju što je pre moguće, da bi se izbegla bilo kakva degradacija. Ako se očekuje bilo kakvo zadržavanje u transportu, preporučuje se transport u virusnoj transportnoj podlozi na ledu ili sa rashlađivanjem na 2-8 °C.

Uzorci krvi

Uzorci krvi (puna krv, serum) prikupljaju se radi serologije antitela (određivanja prisustva antitela protiv virusa influence). Uzorke seruma iz akutne faze i faze rekonvalescencije, uzete u razmaku od 14-21 dan, treba sakupljati radi dokazivanja značajnog (najmanje četverostrukog) porasta titra antitela specifičnih na odgovarajući soj virusa.

Klinička uloga i vrednost laboratorijske diagnostike

Postupak sa pacijentom

Brza dijagnoza je važna ukoliko se razmatra mogućnost rane terapijske intervencije skupim antivirusnim lekovima – da bi bili efikasni, terapija ovim lekovima treba da se otpočne u toku prvih 48 sati od pojave simptoma (WHO 2005a). Kandidati za rano lečenje su bolesnici sa pratećim oboljenjima i stanjima i sa povišenim rizikom od ozbiljnih komplikacija (videti poglavlje „Klinička prezentacija“). Posebno, dijagnoza influence u starijih bolesnika treba kliničara učini

svesnim rizika od nastanka sekundarne infekcije bakterijama kao što su *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*.

Osim toga, brzo testiranje na virus influence igra ulogu u savladavanju infekcije u bolnici, da bi se smanjilo širenje infekcije sa pacijenta na pacijenta ili sa zaraženih zdravstvenih radnika na bolesnike sa povišenim rizikom. Ove testove takođe treba primenjivati u dijagnostici influence kod putnika ili kod epidemija bolesti u poluzatvorenim zajednicama kao što su brodovi za krstarenje (WHO 2005a).

Najzad, dijagnostika influence ima prognostičku vrednost u mladih zdravih odraslih osoba, kod kojih bolest ima kratak i benigni tok.

Nadzor

U sprovođenju nadzora influence primenjuju se razni testovi i tu izgleda da nedostaje standardizacija čak i u Evropskom regionu (Meerhoff 2004). Različite tehnike imaju različite prednosti i nedostatke. Stoga se u nadzoru koriste kombinacije testova. Brze direktne tehnike kao što je RT-PCR (Bigl 2002) ili EIA omogućuju brzu detekciju epidemije i mogu se koristiti u razlikovanju influence A i B. Izolacija virusa u embrionisanim kokošijim jajima ili na ćelijskoj kulturi neophodna je u subtipizaciji virusa. Hemaglutininski i neuraminidazni podtip se određuju testom inhibicije hemaglutinacije i testom RT-PCR. Sekvencioniranje produkata PCR koristi se za utvrđivanje molekulske epidemiologije cirkulišućih virusa. Ovo, zajedno sa titrima inhibicije hemaglutinacije među sojevima omogućuje WHO da preporuči odgovarajuće vakcine koje će najverovatnije štititi protiv cirkulišućih sojeva virusa influence. Nadzor je takođe važan za kreiranje preventivno medicinskih mera, jer uticaj određene epidemije na zdravlje i odnosi cene i koristi (*cost benefit*) intervencija kao što je vakcinacija mogu motivisati kreatore zdravstvene politike da daju prioritet prevenciji influence.

Laboratorijski testovi

Pri odlučivanju o tome koji test primeniti, treba razmotriti mnoge faktore. U obzir treba uzeti i osetljivost, specifičnost, trajanje izvođenja testa, njegovu ponovljivost, lakoću izvođenja i cenu. RT-PCR je generalno osetljivija od serologije i kultivacije, a kombinacija RT-PCR i serologije osetljivija je nego kombinacija bilo koje dve od ostalih metoda (Zambon 2001). Osetljivost kultivacije u velikoj meri zavisi od laboratorije u kojoj se izvodi. Serologija je manje skupa od RT-PCR ali zahteva uzorke krvi – parne serume - iz akutne faze i iz faze oporavka, dijagnoza je samo retrospektivna. Tradicionalna kultivacija dugo traje ali tehnike shell vial kultivacije omogućuju dijagnostiku u roku od 48-72 sata.

Direktne metode

Za direktnu detekciju virusa influence postoje različite metode. Neke, kao što je enzimski radioimunoesej (EIA) pogodne su za testiranje pored bolesničke postelje; drugi, kao što je direktna imunofluorescencija, omogućuju pripremanje pločica predmetnog stakla na licu mesta u ambulanti i slanje fiksiranih pločica u centralnu laboratoriju (Allwinn 2002). RT-PCR tehnika može da izvodi samo obučeno osoblje u dobro opremljenoj laboratoriji. Pomoću ovih metoda moguća je detekcija ili oba tipa virusa influence (A i B), ili ona omogućava njihovo razlikovanje. Jedina direktna tehnika koja ima potencijal za diferencijaciju podtipova (t.j. na osnovu hemaglutinina i neuraminidaze) je RT-PCR.

Imunofluorescencija

Kod tehnike direktne imunofluorescencije, potencijalno inficirane ćelije respiratornog epitela se najpre fiksiraju za predmetno staklo a virusni antigeni sadržani u ćelijama detektuju se specifičnim antitelima koja su ili direktno konjugovana za fluorescentnu boju (direktna

imunofluorescencija) ili anti-antitelima vezanim za fluorescentnu boju (indirektna imunofluorescencija). U oba slučaja reakcija se vizualizuje pod fluorescentnim mikroskopom a pozitivne ćelije se raspoznaju po intenzitetu boje i morfologiji fluorescentnih područja. Direktna imunofluorescencija omogućuje brže rezultate ali je generalno manje osetljiva od indirektna imunofluorescencije. Indirektna imunofluorescencija takođe ima prednost u tome što se mogu koristiti pulovani antiserumi za skrining virusne infekcije pomoću jednog anti-antitela konjugovanog na fluorescentnu boju (obično se koriste anti-mišja antitela konjugovana sa fluorescein izotiocijanatom; Stevens 1969). Imunofluorescencija omogućava brzu dijagnostiku respiratornih uzoraka dok god u uzorcima ima dovoljno epitelnih ćelija. Međutim, postoji interindividualna razlika u tumačenju testova imunofluorescencije jer je interpretacija subjektivna a tačnost zavisi od kompetencije i iskustva onoga ko ih radi.

Enzimski imunološki testovi ili imunohromatografski testovi

Enzimski imunološki testovi (EIA) koriste antitela protiv virusnog antigena koja su konjugovana na neki enzim. Sledi inkubacija sa hromogenim supstratom a promena boje ukazuje na postojanje virusnog antigena. Određeni enzimski testovi kao i slični testovi koji koriste imunohromatografiju omogućuju testiranje uz bolesničku postelju (Allwinn 2002) i traju 10-30 minuta. Ovi brzi testovi generalno su skuplji od direktne imunofluorescencije ili kultivacije virusa. Osetljivost EIA varira između 64% i 78% (Allwinn 2002). Pomoću različitih brzih testova moguća je detekcija virusa influence A i B, bez razlikovanja tipa, samo virusa influence A ili detekcija i identifikacija svakog tipa (A i B) ponaosob. Međutim, nijedan od ovih brzih testova ne može razlikovati podtipove koji inficiraju čoveka (H1N1 i H3N2) ili podtipove ptičjeg gripa (FDA 2005). Spisak raspoloživih brzih testova može se dobiti na sledećem linku: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/labdiagnosis.htm>.

Lančana reakcija reverzne transkripcijske polimeraze (RT-PCR)

RT-PCR je proces u toku kojeg se RNA prvo konvertuje u komplementarnu DNA (cDNA) a onda se deo genoma amplifikuje korišćenjem prajmera koji se vezuju specifično za ovo ciljno područje. Ovo omogućuje eksponencijalnu amplifikaciju malih količina nukleinske kiseline, delovanjem termostabilnog enzima DNA polimeraze, koji omogućuje visoko osetljivu detekciju i minimalnih količina virusnog genoma.

Ne samo da RT-PCR ima izvanrednu osetljivost (Steininger 2002) već se može koristiti i za razlikovanje podtipova i izvođenje filogenetske analize (Allwinn 2002). Degradacija RNA arhivskih uzoraka može sniziti osetljivost RT-PCR (Frisbie 2004). Stoga uzorke treba obrađivati što je brže moguće posle prikupljanja.

Metode izolacije

Izolacija ili kultivacija virusa je tehnika kojom se uzorak inokuliše u živi sistem za kultivaciju i prisustvo virusa se onda detektuje u tom sistemu. Pošto se kultivacijom uvećava (amplifikuje) količina virusa, ona je osetljivija od direktnih metoda, osim RT-PCR (koja takođe koristi amplifikaciju). Izolacija virusa je od koristi samo ako su živi sistem ili ćelije osetljivi na virus koji nameravamo da izolujemo.

Za uspešnu izolaciju je potreban brzi transport uzoraka u laboratoriju, jer kašnjenje može dovesti do inaktivacije virusa (Allwinn 2002).

Kultura embrionizovanih jaja

Uzorci se inokulišu u amnionsku kesu 10-12 dana starih embrionizovanih kokošjih jaja. Posle 3 dana inkubacije može se dobiti visok prinos virusa (WHO 2005d).

Pošto ova tehnika zahteva snabdevanje oplodjenim kokošnjim jajima i specijalne inkubatore, ona se više ne koristi u rutinskoj dijagnostici infekcije influence. Međutim, izolacija na jajima obezbeđuje velike količine virusa i predstavlja vrlo osetljiv sistem kultivacije virusa. Stoga referentne laboratorije koriste ovaj sistem za kultivaciju da bi obezbedile visoku osetljivost i omogućile proizvodnju zaliha virusa za epidemiološki monitoring.

Ćelijska kultura

Konvencionalna kultura: Za izolaciju virusa influence koriste se različite ćelijske linije, najčešće primarne bubrežne ćelije majmuna i Madin-Darby ćelije psećeg bubrega (MDCK). Neki autori preporučuju korišćenje tripsina da bi se potpomogao ulazak virusa u ćelijske linije (WHO 2005d). Konvencionalnoj ćelijskoj kulturi potrebne su dve sedmice ali ima veoma visoku osetljivost. Uočavaju se citopatski efekti kao štosu inkluziona telašca u sincicijumu i intracitoplazmatska bazofilna inkluziona telašca. Prisustvo virusa influence može se utvrditi hemadsorpcijom, korišćenjem eritrocita zamorčeta (Weinberg 2005) ili imunofluorescencijom na kultivisanim ćelijama. Ova potonja se može koristiti i za tipizaciju izolovanog virusa. Imunofluorescencija ima višu osetljivost u detekciji pozitivnih kultura nego hemadsorpcija.

Shell vial kultura: Shell vial kultura omogućuje dijagnostikovanje u roku od 48 sati (Allwinn 2002). Ovo se postiže centrifugiranjem inokuluma na monosloju ćelijske kulture i izvođenjem imunofluorescencije pre nego što se uoči citopatski efekat. Shell vial kultura može međutim imati nižu osetljivost od konvencionalne kulture (Weinberg 2005).

Laboratorijske životinje

Lasice se često koriste u istraživačkim ustanovama kao model za infekciju virusom humane influence, ali nemaju značaja u rutinskoj dijagnostici.

Serologija

Serologija se odnosi na detekciju u serumu (ili drugim telesnim tečnostima) specifičnih antitela na virus influence.

Serološki se mogu detektovati ukupna antitela ili klase specifičnih antitela (IgG, IgA ili IgM).

Za dijagnostikovanje influence raspoložive su različite serološke tehnike: inhibicija hemaglutinacije (HI), reakcija vezivanja komplementa (CF, RVK), enzimske tehnike (EI) i indirektna imunofluorescencija.

Serološka dijagnostika ima malu vrednost u dijagnostici akutne influence. Da bi se dijagnostikovala akutna influenza, potrebno je da se potvrdi bar četvorostruki porast titra, što zahteva uzorke iz akutne faze i faze rekonvalescencije. Međutim, ona može imati značaja u dijagnostikovanju kod nedavno inficiranih osoba.

Serologija se takođe koristi u određivanju odgovora na vakcinaciju protiv influence (Prince 2003).

Serologija ima veći klinički značaj kod pedijatrijskih bolesnika bez prethodne izloženosti influenci, jer prethodna izloženost može dovesti do odgovora heterolognim antitelima (Steininger 2002).

Inhibicija hemaglutinacije (HI)

Testovi HI zahtevaju intenzivan rad i mnogo vremena, kao i nekoliko kontrola radi standardizacije. Međutim, reagensi su jeftini i lako dostupni. Koriste se različita crvena krvna

zrnca, kao npr. eritrociti zamorčeta, pernate živine ili ljudske krvne grupe „O“. Obično se koristi dilucija od 0.4-0.5% eritrocita. Serum se pretretira da bi se uklonili nespecifični hemaglutinini i inhibitori. Onda se sa serumom uzorka u dvostrukim razblaženjima preinkubira preparat virusnog hemaglutinina koji izaziva vidljivu hemaglutinaciju (obično 4 hemaglutinacijske jedinice). Najmanje razblaženje koje još inhibira hemaglutinaciju je titar HI. HI je osetljivija od RVK (Julkunen 1985, Prince 2003) i ima i dodatnu prednost da je specifičnija u razlikovanju podtipova HA (Julkunen 1985).

Reakcija fiksacije komplementa (RVK, CF)

Testovi reakcije vezivanja komplementa zasnivaju se na sposobnosti kompleksa antigen-antitelo da troše komplement, što rezultuje time da ne preostaje komplementa za lizu eritrocita senzibilisanih ovaca. Ovi testovi zahtevaju intenzivan rad i kontrolu za svaku proceduru, ali reagensi su jeftini i lako dostupni. Testovi RVK su manje osetljivi od HI, kako u dijagnostici akutne infekcije tako i u određivanju imuniteta posle vakcinacije (Prince 2003).

Enzimski testovi (EIA)

EIA testovi su osetljiviji od testova HI i CF (Bishai 1978, Julkunen 1985). Raspoloživi su razni komercijalni EIA. Testovi za detekciju IgG i IgA osetljiviji su nego testovi za IgM (Julkunen 1985), ali nisu indikativni za akutnu infekciju.

Indirektna imunofluorescencija

Indirektna imunofluorescencija se obično ne koristi kao metoda za detekciju antitela protiv virusa influence.

Brzi testovi

Klinička vrednost nekog testa za dijagnostiku influence u velikoj meri zavisi od dužine izvođenja dotičnog testa. Prvi testovi razvijeni za dijagnostiku influence bili su izolacija virusa i serološki testovi. U tom stadijumu, da bi se isključila infekcija virusom influence trebalo je više od dve sedmice. Iako su shell vial testovi smanjili vreme potrebno za izolaciju, oni se generalno ne smatraju brzim testovima.

Razvoj direktnih testova kao što je imunofluorescencija omogućio je postavljanje dijagnoze u roku od nekoliko sati (1 do 2 koraka inkubacije i ispiranja). Međutim, testovi imunofluorescencije zahtevaju iskusne laboratorijske radnike i imunofluorescentne mikroskope.

Revoluciju u brzost dijagnostici influence doneo je razvoj brzih testova za antigene (od kojih većina radi na principu EIA ili imunohromatografije). Neke od ovih testova toliko je lako izvoditi da čak i nelaboratorijsko osoblje može da ih izvodi u ambulantnim uslovima, što se označava kao testiranje kraj bolesničke potelje ili testiranje na mestu zbrinjavanja.

Reakcije RT-PCR koje zahtevaju elektroforezu u gelu u početku su zahtevale dosta vremena, ali relativno nedavni razvoj tehnologije u realnom vremenu omogućio je dijagnostiku pomoću RT-PCR u roku od dva sata. Iako su antigenski testovi generalno najlakši za rukovanje, oni nisu tako osetljivi kao direktna imunofluorescencija, izolacija ili RT-PCR.

Na tabeli je dat prikaz poređenja karakteristika različitih postojećih metoda testiranja za dijagnostiku influence.

Tabela 1: Poređenje karakteristika testova*				
Test	Osetljivost	Vreme potrebno za izvođenje	Lakoća izvođenja	Dostupnost
<i>Direktna detekcija</i>				
Brzi testovi (EIA / hromatografija)	-2	+2	+2	0
Imunofluorescencija	0	+1	+1	+1
Gel elektroforeza RT-PCR	+2	0	-1	-2
Real-time RT-PCR	+2	+1	-1	-2
<i>Kultivacija virusa</i>				
Rutinska kultivacija virusa	+2	-2	-1	+2
Shell vial kultura	+1	0	-1	+1
<i>Serologija</i>				
EIA	+2	-2	+1	+1
Inhibicija hemaglutinacije	+1	-2	-1	+2
RVK	0	-2	-2	+2

*Relativni kriterijum za pogodnost testova (5 poena ordinalne skale)

-2: vrlo nepodobna karakteristika

-1: nepodobna karakteristika

0: prosečna karakteristika

+1: pogodna karakteristika

+2: vrlo pogodna karakteristika

Diferencijalna dijagnostika oboljenja nalik influenci

Raznovrsni simptomi opisuju se kao „nalik influenci“: povišena temperatura, kašalj, zamućenost nosa, glavobolja, nelagodnost, bol u mišićima. Međutim, ne postoji jasna definicija niti uniformnost u korišćenju ovog termina.

Tokom epidemije, visoko prediktivni za influencu su klinički simptomi kao što je povišena temperatura, kašalj, teški nazalni simptomi i gubitak apetita (Zambon 2001). Međutim, i mnoge druge infekcije mogu se prezentovati simptomima nalik influenci. To mogu biti infekcije virusima, bakterijama, mikoplazmama, hlamidijama i gljivicama, kao i infestacije parazitima. U početku se simptomima nalik influenci mogu prezentovati i infekcije koje mogu ugroziti život čak i mladim i zdravim osobama, kao što su virusne hemoragijske groznice, ili infekcije kao legioneloza, koja može ugroziti život rizičnim grupama kao što su stare osobe. Stoga je važno razmotriti široku diferencijalnu dijagnostiku koja treba da se usmeri prema pacijentovoj anamnezi, uključujući i putovanja, profesionalnu izloženost, kontakt sa životinjama i bolesnicima, anamnezu simptoma kao i lokalne epidemiološke podatke.

Dijagnoza suspektne humane infekcije virusom ptičjeg gripa

Uvod

Tačno i brzo razjašnjenje suspektnih slučajeva H5N1 infekcije na osnovu laboratorijske dijagnostike je od najveće važnosti za otpočinjanje i nastavljanje odgovarajućeg lečenja i mera kontrole infekcije. Izolaciju virusa iz uzoraka kod suspektnih slučajeva ptičjeg gripa treba obavljati u specijalizovanim referentnim laboratorijama sa opremom čiji je nivo biobzbednosti najmanje 3.

Prikupljanje uzoraka

Uzorke za detekciju ili izolaciju treba uzeti prva tri dana od pojave simptoma i brzo ih transportovati u laboratoriju. Za dijagnostiku su podesni aspirat nazofarinksa, bris nosa, bris nazofarinksa ili bris guše. Međutim, aspirat nazofarinksa je uzorak izbora. U slučajevima kada su pacijenti intubirani, mogu se sakupljati transtrahealni aspirati i bronhoalveolni lavat.

Istovremeno, treba uzeti uzorke seruma u akutnom stadijumu i stadijumu rekonvalescencije za serološku dijagnozu (WHO 2005).

Modaliteti virusološke dijagnostike

Brza identifikacija infektivnog agensa kao virusa influence A može se izvesti običnim brzim testovima za influencu, koji vrše diferencijaciju tipova. Međutim, komercijalne brze hromatografske metode, u poređenju sa kultivacijom, za ptičji grip imaju osetljivost od samo 70% (Yuen 2005). Direktna dijagnostika infekcije virusom influence H5N1 može se izvesti indirektnom imunofluorescencijom na respiratornim ćelijama fiksiranim na predmetnom staklu, korišćenjem kombinacije specifičnih monoklonskih antitela za influencu tip A/H5, influencu A i influencu B, kao i specifičnih monoklonskih antitela za influencu A/H1 i A/H3 (dobija se od WHO) i anti-mišjeg FITC za detekciju. Ovaj test omogućuje brzo razlikovanje humane infekcije influencom H5 od drugih tipova i podtipova influence, ali ne može da isključi H5N1 infekciju usled nedovoljne osetljivosti. Stoga takođe treba raditi kultivaciju i/ili RT-PCR koje su osetljivije.

Virus se može izolovati na embrionizovanim kokošnjim jajima, Madin Darby ćelijama psećeg bubrega (MDCK) ili bubrežnim ćelijama rebus majmuna (LLC-MK2) (de Jong 2005, Yuen 2005). Druge uobičajene ćelijske linije, kao Hep-2 ili RD, takođe su upotrebljive za A/H5 virus ptičjeg gripa. Citopatski efekti su nespecifični i infekcija ćelija virusom influence A može se detektovati imunofluorescencijom na nukleoprotein. Za subtipizaciju ovih virusa mogu se koristiti HI supernatanta ćelijske kulture, H5-specifična imunofluorescencija (korišćenjem monoklonskih antitela protiv H5) ili RT-PCR. Dostupni su prajmeri za detekciju i H5 i N1 gena ptičjeg gripa pomoću RT-PCR (WHO 2005c). Takođe su dostupni i H9-specifični prajmeri (WHO 2005c).

Detekcija influence A/H5 pomoću RT-PCR u realnom vremenu nudi brzu i visoko osetljivu metodu za dijagnostiku H5N1 infekcije (Ng 2005).

Serologija: Četvorostruki porast titra u uzorku dobijenom u fazi rekonvalescencije u odnosu na uzorak iz akutne faze, takođe potvrđuje dijagnozu infekcije u pacijenta koji se oporavio (Yuen 2005).

Drugi laboratorijski nalazi

Uobičajeni nalazi su leukopenija i naročito limfopenija (za koju je dokazano da je znak loše prognoze kod pacijenata iz Tajlanda), trombocitopenija i umereno povišene vrednosti transaminaza (Beigel 2005).

Nova kretanja i budućnost na području dijagnostike influence

Zapaženo je nekoliko trendova u dijagnostici influence. Dostupnost lekova protiv influence koji se moraju davati rano u toku infekcije da bi bili efikasni istakla je potrebu za ranom dijagnostikom koja je stimulisala razvoj mnogih EIA ili imunohromatografskih brzih testova koji su tako nekomplikovani da omogućuju testiranje kraj bolesničke postelje. Ipak, vrednost ovih testova je ograničena njihovom relativno niskom osetljivošću, naročito u dijagnostici ptičjeg gripa.

RT-PCR u realnom vremenu nudi visoko osetljivu i specifičnu alternativu. Tehnološki razvoj čini RT-PCR u realnom vremenu pristupačnijom jer instrumenti postaju sve manji, efikasniji i prilagođeniji korisniku. Stoga se RT-PCR u realnom vremenu već istakla u gotovosti za pandemiju influence jer će omogućiti da laboratorije obavljaju brzu osetljivu i specifičnu dijagnostiku humanih slučajeva ptičjeg gripa. Jedina preostala prepreka je njena relativno visoka cena; ali visoko kompetitivno tržište već je učinilo ove testove finansijski podnošljivijim.

Zaključak

Molekularne dijagnostičke tehnike igraju sve istaknutiju ulogu u laboratorijskoj dijagnostici influence. Direktni brzi testovi takođe su postali važno oruđe u istraživanju oboljenja sličnih influenci.

Kultivacija virusa međutim ostaje važna naročito za referentne laboratorije jer je jeftina, osetljiva i omogućuje karakterizaciju virusa. Dalje, za razliku od molekularnih ispitivanja, ona je „nepristrasna“ i može detektovati neočekivani novi soj.

Glavna vrednost serologije influence leži u epidemiološkim istraživanjima godišnjih epidemija, transmisije sa ptica na čoveka i ispitivanje lekova i vakcina. Za rutinsku dijagnostiku ona ima ograničenu vrednost.

Tako, možemo zaključiti da virusološka dijagnostika influence ima vrednost za pojedinačnog pacijenta, epidemiološka istraživanja i kontrolu infekcije. Odgovarajući odabir testa određen je karakteristikama testa i potrebama za specifičnošću dijagnostike ili preventivnomedicinskih potreba.

Pozitivni dijagnostički test pravi razliku između toga da li neko ima bolest sličnu gripu ili definitivnu dijagnozu gripa, ili između suspektnog i potvrđenog humanog slučaja ptičjeg gripa.

Korisni izvori na Internetu vezani za dijagnostiku influence

<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://www.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 identify avian influenza A virus in specimens from humans. Geneva: 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>