

**В. А. Ячник**  
**АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО ЗАГОСТРЕННЯ**  
**БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ**

*Державна установа «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»*

**АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО ОБОСТРЕННЯ**  
**БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ ВІРУСНОЇ ЕТІОЛОГІЇ**

**В. А. Ячник**

*Резюме*

Широкая распространенность вирус-индуцированного обострения бронхиальной астмы (до 60–80 % всех обострений) и отсутствие доказанных рекомендаций по ее своевременной этиологической диагностике существенно влияет на эффективность лечения и развитие осложнений.

Разработана и апробирована схема диагностики инфекционного обострения бронхиальной астмы (БА) вирусной этиологии, основанная на рекомендациях «Клинического протокола оказания медицинской помощи по специальности «Пульмонология» больным БА» (приказ МЗ Украины № 128 от 19.03.2007 г.). Она предусматривает параллельный диагностический поиск с целью установления у больного наличия клинико-функциональных признаков обострения БА, определение его инфекционного характера и лабораторное подтверждение вирусной этиологии обострения.

Суть предложенной схемы диагностики обострения БА вирусной этиологии заключается в применении дополнительных лабораторных методов обследования, а именно: «быстрых» иммунохроматографических тестов, полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием мультиплексных вирусных тест-систем и количественного нефелометрического определения уровня С-реактивного протеина сыворотки крови.

Дополнительное использование современных лабораторных методов диагностики наряду с клинико-функциональным обследованием больных позволило своевременно провести раннюю дифференциальную диагностику обострения БА, определить его инфекционный характер и подтвердить этиологическую значимость вирусных возбудителей у 51,7 % больных.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, инфекционное обострение, вирусы, диагностика.

**Укр. пульмонол. журнал. 2014, № 1, С.31–38.**

*Ячник Віталій Анатолійович*  
*ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології*  
*ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»*  
*Молодший науковий співробітник*  
*10, ул. М. Амосова, Київ, 03680*  
*Тел.: +380976586226, yachvit@mail.ru*

**ALGORITHM OF DIAGNOSING OF VIRUS-INDUCED**  
**ASTHMA INFECTIOUS EXACERBATION**

**V. A. Iachnyk**

*Abstract*

High prevalence of virus-induced exacerbation of asthma (up to 60–80 % of all exacerbations) and the lack of proven recommendations on its up-to-date etiological diagnosing significantly affect the effectiveness of treatment and occurrence of complications.

Based on recommendations of “Clinical protocol of standard of care in pulmonology for asthma patients” (Ministry of Health of Ukraine Decree # 128, dated 19.03.2007) we developed and tested a procedure for diagnosing of infectious exacerbation of asthma. It relies on parallel diagnostic detection of clinical and functional signs of asthma exacerbation and determination of its infectious nature, and confirmation of the viral etiology of this condition.

The principles of proposed diagnostic method consist of the use of the following additional laboratory tests: quick immunochromatographic tests, multiplex polymerase chain reaction and quantitative nephelometric blood serum C-reactive protein measurement.

Additional use of modern laboratory diagnostic methods in combination with clinical and functional examination helped to make timely differential diagnosis of asthma exacerbation, determine its infectious nature and confirm viral etiology in 51,7 % of patients.

**Key words:** asthma, infectious exacerbation, viruses, diagnostics.

**Ukr. Pulmonol. J. 2014; 1: 31–38.**

*Vitaliy A. Iachnyk*  
*SO “National institute of phthisiology and pulmonology*  
*named after F. G. Yanovskiy NAMS of Ukraine”*  
*research assistant*  
*10, M. Amosova str., 03680, Kyiv, Ukraine*  
*Тел.: +380976586226, yachvit@mail.ru*

В світі близько 300 млн людей страждають на бронхіальну астму (БА). Розповсюдженість БА в різних країнах світу коливається від 1 до 18 %. За оцінками спеціалістів, від ускладнень цієї хронічної недуги помирають близько 250 000 чоловік на рік. Значну кількість пацієнтів щорічно госпіталізують з приводу тяжкого інфекційного загострення БА. Отже діагностика і лікування хворих із інфекційним загостренням бронхіальної астми є актуальною проблемою пульмонології [1].

При обстеженні і лікуванні хворих із загостренням БА надзвичайно важливо вчасно діагностувати етіологічний чинник загострення, що дає можливість адекватно призначити лікування, зменшити тривалість та тяжкість загострення. За результатами сучасних досліджень тригерами загострення БА можуть бути різні фактори навколишнього середовища, в тому числі бактеріальні та вірусні етіопатогени [2–4]. З 1960-х років почали говорити про віруси як про одні із основних тригерів загострення астми. Після залучення в 1990-х роках до медичної практики методу полімеразної ланцюгової реакції

(ПЛР) роль респіраторних вірусів при загостренні БА остаточно підтвердилась. Бронхіальну обструкцію та загострення астми можуть викликати різні віруси: риновірус, респіраторно-синцитіальний вірус (РС-вірус), віруси грипу А і В, аденовірус, вірус парагрипу, коронавірус, метапневмовірус та інші [3–9].

Епідеміологічні та імунопатофізіологічні дослідження показують, що найпоширенішою причиною загострень БА — в 80–85 % випадків у дітей і в 60–70 % у дорослих — є гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ). І хоча інфекційні загострення БА залежать і від інших чинників (фенотипічних, анамнестичних, від попереднього базисного лікування, тривалості загострення та ін.) ці цифри вказують на колосальну роль вірусів у цьому процесі [3, 12, 13].

Механізми розвитку інфекційного загострення (ІЗ) БА вкрай складні та недостатньо вивчені. За даними численних експериментальних досліджень встановлено, що один із основних патогенетичних механізмів БА — розвиток гіперреактивності дихальних шляхів (посилення як чутливості, так і потужності відповіді бронхів на різні подразники), який виникає на тлі «еозинофільного» запалення [10–13]. Одним із важливих факторів патогенного впливу ГРВІ є погіршення стану мукоциліарного кліренсу і пригнічення фагоцитарної активності альвеолярних макрофагів [4, 6, 8, 12–14]. Це створює умови для приєднання бактеріальної інфекції та формування вірусно-бактеріальних асоціацій. Найчастіше при ГРВІ виявляється інфікування *M. pneumoniae* та *S. pneumoniae*, що призводить до більш тривалого і важкого перебігу загострення БА [4].

До останнього часу основні діагностичні заходи при такій патології в Україні регламентуються наказом № 128 МОЗ України від 19.03.2007 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія» і наказом № 868 МОЗ України від 08.10.2013 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при бронхіальній астмі». Однак в цих документах дані щодо діагностичної тактики при інфекційному загостренні БА і особливо вірус-індукованому — відсутні.

Для більш успішного етіотропного лікування хворих з інфекційним загостренням БА, важливо визначити характер цього процесу (вірусний чи бактеріальний) і віддиференціювати провідні етіологічні збудники, виявити їх спектр.

Запальний процес при загостренні БА, як і при будь-якому запальному захворюванні, призводить до оксидативного стресу і супроводжується зміною рівнів запальних медіаторів та білків. Велике діагностичне значення мають білки гострої фази, що з'являються в плазмі крові через 4–6 годин після ураження тканини і вказують на вираженість запального процесу в організмі [15, 16].

Результатами досліджень, присвячених вивченню біохімічних та імунологічних маркерів запалення, зокрема С-реактивний протеїн (CRP), цитокінів, інтерлейкінів, рівню оксиду азоту у хворих на бронхообструктивні захворювання легень, доведено, що рівень CRP має важливе клініко-діагностичне значення для визначення сту-

пеня тяжкості захворювання, раннього прогнозування наслідків його загострення та оцінки ефективності призначеного лікування [17–19].

CRP — білок гострої фази, що отримав свою назву через здатність вступати в реакцію преципітації з С-полісахаридом пневмококів (один із механізмів раннього захисту організму від інфекції). CRP стимулює імунні реакції, в т.ч. фагоцитоз, бере участь у взаємодії Т- і В-лімфоцитів, активує класичну систему комплементу. Нормальна концентрація CRP в плазмі здорової людини — 1,0 мг/л. Виробляється білок переважно в гепатоцитах. Його синтез ініціюється антигенами, імунними комплексами, інфекційними агентами (бактеріями, грибами). Характерною особливістю даного білку є те, що з переходом захворювання у хронічну стадію його рівень знижується до повного зникнення, а при загостренні процесу знову зростає [15, 18, 20, 21].

Класичні методи визначення концентрації CRP в плазмі/сироватці крові — це радіальна імунодифузія, імунотурбідиметрія і нефелометрія. Діапазон концентрацій CRP, який визначається зазначеними методами, знаходиться в інтервалі 5–500 мг/л і більше. Досить довго діагностичне значення CRP співвідносили саме з показниками, що перевищують 5 мг/л. При концентрації CRP менше 5 мг/л констатували відсутність системної запальної відповіді і не вважали точно визначення концентрації CRP клінічно значущим. В останні 10 років була розроблена методика іммобілізації антитіл до CRP на частинках латексу, що збільшило чутливість визначення CRP приблизно в 10 разів. Нижня межа області визначення CRP при використанні високочутливої імунотурбідиметрії з латексним посиленням склала <0,5 мг/л. CRP, визначений таким чином, в літературі називають високочутливим (hsCRP). У результаті з'явилася можливість визначати базовий рівень CRP, тобто концентрацію CRP у практично здорових осіб, а також у пацієнтів при відсутності гострого запального процесу або поза загостренням захворювання [22].

При гострій бактеріальній інфекції спостерігаються найвищі рівні CRP (100 мг/л і більше). При ефективній терапії запального процесу рівень CRP знижується вже наступного дня, і нормалізується на 6–10 добу, тоді як швидкість осідання еритроцитів при успішному лікуванні знижується тільки через 2–4 тижні. Таким чином, швидка нормалізація рівня CRP дозволяє використовувати цей тест для спостереження за перебігом хвороби та контролем ефективності лікування [15].

При вірусній інфекції CRP підвищується незначно (менше 20 мг/л), що дозволяє використовувати даний показник активності запального процесу для диференційної діагностики бактеріальної і вірусної інфекції [17, 18].

В останні роки для виявлення та ідентифікації респіраторних вірусів широко використовують молекулярні методи, специфічність яких базується на унікальності нуклеотидних послідовностей вірусних геномів. Сучасним молекулярним методом діагностики вірусних геномів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Перевагами методу ПЛР є висока специфічність, чутливість, універсальність процедури, простота і зручність проведення аналізу, можливість виявлення відразу кіль-

кох патогенів в одній пробірці, за умов наявності в реакційній суміші декількох пар відповідних праймерів (мультиплексна ПЛР) [23]. Використовують ряд різних модифікацій цього методу, в тому числі ПЛР з гібридаційною ідентифікацією продуктів ампліфікації, мультиплексну ПЛР, а також ПЛР у режимі реального часу (PCR-FRT). Мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція, мультипраймерна полімеразна ланцюгова реакція (multiplex ПЛР, multiprimer ПЛР) [лат. multum — багато і plex — складка, згин] — полімеразна ланцюгова реакція, в якій одночасно використовують більше однієї пари олігонуклеотидних праймерів, що дозволяє проводити скринінг відразу декілька геномів.

Поряд з ПЛР, в сучасній вірусології, певне місце посідає метод імунохроматографічного аналізу (ІХА), як метод експрес-діагностики. В основі методу — специфічна взаємодія антигенів і антитіл на хроматографічній мембрані після її змочування рідиною досліджуваного зразка від хворого. Така взаємодія відбувається внаслідок дифузного переміщення індикаторного імуноного компоненту, забарвленого колоїдним золотом (КЗ), заздалегідь нанесеного на мембрану, та антигенів досліджуваного зразка після нанесення останнього на мембрану. Для візуального виявлення специфічної імуноної реакції в певній зоні-смугі хроматографічної мембрани попередньо жорстко сорбовані необхідні компоненти, які дозволяють сконцентрувати барвник у вигляді забарвленої смуги.

Всі ці обставини обумовили доцільність використання сучасних вірусологічних методів для визначення основних етіопатогенів інфекційного загострення вірусної етіології і біохімічного маркера запалення (С-реактивний протеїн) для диференціальної діагностики характеру загострення та контролю ефективності терапії таких хворих.

*Мета роботи:* розробка оптимальної схеми обстеження хворих із інфекційним загостренням БА. Робота виконана за коштидержбюджету.

### Матеріал і методи

Для досягнення мети об'єктом дослідження були хворі з ІЗ БА та біологічний матеріал, отриманий від них — мазки з слизової носової порожнини, кров. В дослідження включали хворих лише за умов їх добровільної згоди з метою та об'ємом запланованих обстежень, необхідністю призначення антиінфекційної терапії та можливим ризиком виникнення її побічних ефектів.

Критерії включення пацієнтів у дослідження:

вік 18 років та більше;

наявність у хворого загострення БА відповідно до критеріїв наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007 [2];

підтверджений за результатами клінічного та/або лабораторного методів дослідження інфекційний характер загострення БА.

Критерії виключення:

- неінфекційний характер загострення БА;
- проведення протівірусної та / або антибактеріальної терапії впродовж останніх 2 міс. з приводу будь-якого захворювання;
- наявність у хворого тяжких супутніх захворювань:

туберкульозу, онкологічних захворювань, ВІЛ/СНІДу, алкогольної та/або наркотичної залежності, декомпенсованої серцевої, печінкової, ниркової недостатності та ін.;

- наявна або передбачувана непереносимість препаратів дослідження;
- вагітність або лактація;
- відмова пацієнта від участі у дослідженні.

Відповідно до наведених критеріїв у дослідження було включено 116 хворих з ІЗ БА: 52 (44,8 %) чоловіка і 64 (55,2 %) жінки у віці 20 — 82 років (середній вік —  $(50,4 \pm 1,5)$  року), які обстежувались та лікувались в амбулаторних умовах ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського Національної академії медичних наук України» (НІФП НАМН).

Хворим проводили загальні методи обстеження згідно наказу МОЗ України № 128 від 19.03.2007. Оцінювались анамнестичні дані (давність захворювання, фактори ризику розвитку та загострення БА, перебіг захворювання та рівень його контролю з використанням АСТ-тесту (частота денних та нічних симптомів БА, застосування та кількість доз бронхолітиків за потребою, кількість та тривалість загострень БА за останні 12 міс, проведення базисної терапії БА та лікування її загострень з експертною оцінкою адекватності призначень та клінічної ефективності попередньої терапії, проведення вакцинопрофілактики грипу тощо), клінічні дані (загальний стан хворого, обмеження його активності, наявність та рівень порушень свідомості, мови; характер та рівень задишки, кашлю; кількість та характер мокротиння, клінічні прояви ГРВІ (гіперемія м'якого піднебіння та задньої стінки зіву, кон'юнктив, прояви риніту, рясне потовиділення, слабкість, світлобоязнь, суглобові та м'язові болі, головний біль), участь в диханні допоміжної мускулатури, аускультативні дані (наявність та характер хрипів), температура тіла, частота дихання, артеріальний тиск, частота серцевих скорочень (ЧСС), сатурація крові ( $SpO_2$ ), данні функціонального обстеження легень до та після застосування бронхолітиків короткої дії (життєва ємність легень (ЖЄЛ) (% від належної величини), форсована життєва ємність легень (ФЖЄЛ) (%), пікова об'ємна швидкість видиху (ПОШ) (%), об'єм форсованого видиху за 1 секунду (ОФВ<sub>1</sub>) (%), відношення абсолютних величин ОФВ<sub>1</sub> і ФЖЄЛ, максимальна об'ємна швидкість повітря на рівні видиху 25,0 % ФЖЄЛ (МОШ<sub>75</sub>) (%), максимальна об'ємна швидкість повітря на рівні видиху 50,0 % ФЖЄЛ (МОШ<sub>50</sub>) (%), максимальна об'ємна швидкість повітря на рівні видиху 75,0 % ФЖЄЛ (МОШ<sub>25</sub>) (%), МОШ<sub>25-75</sub> — максимальна об'ємна швидкість між 25,0 і 75,0 % ФЖЄЛ на базі комп'ютерної обробки показників спірографії, кривої «потік-об'єм» форсованого видиху з використанням апарату «Master Screen PFT» (Німеччина).

Для виявлення вірусів у роботі використовували комплекс методичних підходів, що включали в себе сучасні експрес-методи індикації вірусів та вірусних антигенів в клінічному матеріалі — прості/швидкі тести на основі імунохроматографічного аналізу та полімеразну ланцюгову реакцію з фіксацією результату або в реальному часі — realtime-ПЛР або з використанням агарозного гелю та забарвлення зразків ДНК бромідом етідію [68]. Для вірусоло-



логічного дослідження в усіх хворих проводили забір біоматеріалу у вигляді мазку або змиву з слизової носової порожнини [24–27]. Мазки відбирали сухими стерильними зондами з ватними тампонами.

Для експрес-діагностики грипу А і В, аденовірусу та РС-вірусу використовували прості/швидкі імунохроматографічні тести «CITO TEST INFLUENZA A&B» (Фармаско, Україна) та «CERTEST RSV-ADENO RESP BLISER TEST» (SerTest, Іспанія). В основі їх дії покладено метод імунохроматографічного аналізу (ІХА) — специфічної взаємодії антигенів і антитіл на хроматографічній мембрані тесту після її змочування рідиною досліджуваного зразка від хворого. Така взаємодія відбувається внаслідок дифузного переміщення індикаторного імунного компонента, забарвленого колоїдним золотом (КЗ), заздалегідь нанесеного на мембрану, та антигенів досліджуваного зразка після нанесення останнього на мембрану. Для візуального виявлення специфічної імунної реакції в певній зоні-смугі хроматографічної мембрани попередньо жорстко сорбовані необхідні компоненти, які дозволяють сконцентрувати барвник у вигляді забарвленої смуги.

Для ПЛР-дослідження з метою запобігання інактивації вірусів мазок з носової порожнини вміщували в пробірку з 2,0–3,0 мл спеціального вірусного транспортного середовища (ВТС) або у фізіологічний розчин. Кінчик зонда відламували або відрізали з розрахунку можливості щільно закрити кришку пробірки. Пробірку із транспортним середовищем та частиною зонду закривали і поміщали у спеціальний штатив та транспортували до лабораторії. Матеріал (змив або мазок із слизової носової порожнини) для дослідження транспортували у контейнерах з холодоагентом при температурі + 4 °С до лабораторії кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України (завідувачка кафедри д-р мед. наук, проф. Дзюблик І. В.).

Використання PCR-FRT дозволило проводити виявлення продуктів ампліфікації в процесі реакції і вести кількісний облік вірусних нуклеїнових кислот. Подібний підхід дозволив відмовитися від стадії електрофорезу, що сприяло зменшенню ймовірності контамінації досліджуваних зразків продуктами ампліфікації, а також дозволило знизити вимоги, що виставляються до PCR лабораторії. Екстракцію ДНК / РНК з досліджуваного біологічного матеріалу і зворотну транскрипцію проводили використовуючи набір реагентів РИБО-преп “АмпліСенс® ГРВІ-скрін-FL”, виробництва ФБУН ЦНІІЕ РФ. Для аналізу та інтерпретації результатів був використаний сучасний прилад для PCR-FRT Rotor-Gene Q (QIAGEN), виробництва Німеччина, що дозволило в одній пробірці проводити і детектувати в режимі реального часу від 2 до 6-ти незалежних реакцій, з використанням зондів, мічених різними флуоресцентними барвниками (мультиплексна PCR-FRT). Таким чином ми використовували метод мультиплексної ПЛР тест-системи для одночасного виявлення в клінічних зразках основних збудників ГРВІ, що є досить актуальним завданням діагностики бронхо-легеневих захворювань.

Для вивчення спектру вірусних збудників викорис-

товували системи на основі мультиплексної PCR-FRT для ідентифікації респіраторно-синцитіальних вірусів (human Respiratory Syncytial virus — hRSv), метапневмовірус (human Metapneumovirus — hMpv), вірусів парарипу 1, 2, 3 і 4 типів (human Parainfluenzavirus — 1-4 hPiv), коронавірусів (human Coronavirus — hCov), риновірусів (human Rhinovirus — hRv), аденовірусів груп В, С і Е (human Adenovirus В, С, Е — hAdv) і бокавіруса (human Bocavirus — hBov) в клінічному матеріалі з верхніх дихальних шляхів.

За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції визначали наявність маркерів ДНК/РНК збудників: аденовірусу, бокавірусу, метапневмовірусу, коронавірусу, вірусу грипу А (субтипів Н1, Н3, Н5), вірусу грипу В, РС-вірусу А і В, риновірусу, коронавірусу.

Пробірку з матеріалом (мокротиння) центрифугували протягом 10 хв при 14 000 об/хв. Рідину над осадом видаляли і залишали в пробірці приблизно 50 мкл (осад + рідка фракція). Для обробки декількох (N) зразків в окремій пробірці змішували 150 X (N + 1) мкл лізуючого розчину (GuSCN) та 20 X (N + 1) мкл заздалегідь ресуспензованого сорбенту. В кожну пробірку із зразком дослідження додавали 170 мкл отриманої суміші та струшували на вортексі протягом 3–5 с. Пробірку витримували в термостаті протягом 20 хв при 50 °С та центрифугували при 14 000 об/хв протягом 1 хв. Видаляли рідину над осадом і додавали до нього 200 мкл промивного розчину № 1. Пробірку струшували на вортексі протягом 3–5 сек, а потім центрифугували протягом 1 хв при 14 000 об/хв. Видаляли рідину над осадом та додавали до нього 200 мкл промивного розчину № 2. Струшували пробірку на вортексі протягом 3–5 сек та центрифугували пробірку протягом 1 хв при 14 000 об/хв. Видаляли рідину над осадом та додавали до нього 200 мкл промивного розчину № 3. Струшували пробірку на вортексі протягом 3–5 сек і центрифугували пробірку протягом 1 хв при 14 000 об/хв. Видаляли рідину над осадом. Пробірку витримували в термостаті протягом 5 хв при 50 °С з відкритою кришкою. До осаду додавали 10 мкл елюючого розчину та струшували пробірку на вортексі протягом 5 — 10 сек. Пробірку витримували в термостаті протягом 5 хв при 50 °С, а потім центрифугували при 14 000 об/хв протягом 1 хв. Рідину над осадом використовували для внесення в реакційну суміш для ПЛР-ампліфікації.

Для проведення ПЛР готували суміш 18 X (N + 1) мкл буферного розчину та 2 X (N + 1) мкл специфічних запалів (праймерів) з дезоксинуклеотидтрифосфатами. В кожну пробірку вносили по 20 мкл приготованої суміші та гранулу парафіну. В термостаті вміст пробірки нагрівали до 80 °С протягом 3–10 хв. Пробірки охолоджували до кімнатної температури до повного застигання парафіну. В окремій пробірці готували другу половину суміші 10 X (N + 1) мкл буферного розчину та 0,5 X (N + 1) мкл термостійкої полімерази. Отриману суміш вносили по 10 мкл в кожну пробірку на шар парафіну. Також в кожну пробірку додавали по 1 краплі (приблизно 20 мкл) мінерального мастила. Останнім на внутрішню стінку кожної пробірки додавали по 5 мкл зразка препарату ДНК. Пробірки центрифугували при 1000 об/хв протягом 1–3

сек. Підготовлені пробірки розміщували в ампліфікаторі МС2, який запрограмований на об'єм реакційної суміші — 35 мкл в режимі «Precise» (точний). Режим ампліфікації (температура, тривалість та кількість повторів) визначали з урахуванням вимог інструкції з використання відповідного комплексу реагентів.

Результат реакції ампліфікації реєстрували за допомогою горизонтального гель-електрофорезу в агарозному гелі з додаванням броміду етидію. Продукт ампліфікації був видимий в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 254 нм) як стрічка жовтогарячого кольору.

Для проведення ПЛР використовували тест-системи:

- набір реагентів для виділення РНК та ДНК «Рибо-сорб»;
- набір реагентів для проведення зворотної транскрипції — «Реверта-Л»;
- набір реагентів для виявлення та диференціації вірусів грипу А та В — «Ампли-Сенс Influenza virus A/B- FL»;
- набір реагентів для виявлення та ідентифікації вірусу грипу А (H1N1) 2009 «Ампли-Сенс Influenza virus A/H1swine — FL»;
- набір реагентів для виявлення 12-ти вірусів-збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій «RV-12 SEE GENE» (ALT, Україна).

Для постановки ПЛР у реальному часі використовували ампліфікатор «RotorGene 6000», (Corbett Research, Австралія).

Для оцінки вираженості запальної реакції використовували кількісне нефелометричне визначення рівня С-реактивного білка (СРБ) в сироватці або плазмі крові, яке проводили за допомогою біохімічного аналізатора Turboх/Turbox® plus (Orion Diagnostica, Фінляндія). Визначення рівня СРБ базується на кількісній оцінці імунопреципітації в рідкій фазі нефелометричним визначенням по кінцевій реакції. Для цього антисироватка до СРБ розводиться буферним розчином та додається до кратної кількості сироватки крові пацієнта. Після інкубації отриманого розчину вимірюється інтенсивність світла, розсіяного утвореним комплексом антиген-антитіло. Отримана величина прямо пропорційна концентрації СРБ у зразку. Попереднє калібрування кривої визначається специфічними для партії параметрами на магнітній картці. Одноелементе калібрування кривої під час дослідження проводиться калібрувальним розчином, який входить до набору. Результат дослідження відображається в мг/л. Діапазон вимірювання становить 10–150 мг/л. Визначення СРБ у здорових людей показало, що нормальний його рівень дещо нижче 10 мг/л. Рівень СРБ зростає швидко і його можна визначати вже через 6–12 год від початку розвитку запального процесу [22].

### Результати та обговорення

Для вирішення завдань роботи була запропонована схема діагностики ІЗ БА вірусної етіології. При розробці схеми діагностики враховані рекомендації «Клінічного протоколу надання медичної допомоги за спеціальністю «Ппульмонологія» хворим на бронхіальну астму», затвердженого наказом МОЗ України № 128 від 19.03.2007 р. Запропонована схема передбачає поетапний діагностичний пошук з метою встановлення у хворого клініко-функціональних ознак загострення БА, визначення наявності

інфекційного (вірусного) процесу та лабораторне підтвердження вірусної етіології загострення. Схема (алгоритм) діагностичного пошуку наведені на рисунку 1.

Діагноз БА та її загострення встановлювали за наявності у хворого клінічних і функціональних проявів захворювання.

Для визначення ролі вірусів в розвитку загострення БА, а також встановлення спектру вірусних збудників, нами розроблений алгоритм лабораторної діагностики, який полягає в використанні сучасних імунохроматографічних експрес-тестів в поєднанні з молекулярно-біологічною ПЛР-діагностикою (рис. 1).

Швидкість, простота виконання, висока інформативність та відсутність потреби в додаткових коштовних реактивах та устаткуванні визначають перевагу швидких ІХА-тестів перед традиційними методами досліджень, такими як класична вірусологічна та серологічна діагностика, методи флуоресціюючих антитіл (МФА) та імуноферментний аналіз (ІФА). Перед проведенням обстеження пацієнтів даними тестами (швидкі ІХА-тестів «СГО TEST INFLUENZA А+В» та ПЛР) в лабораторії кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України (НМАПО) (зав. кафедри д-р мед. наук, проф. Дзюблик І. В.) було проведено вивчення їх ефективності. Отримані рівні чутливості для ПЛР та ІХА-тестів 100,0 та 99,1 %, специфічності — 100,0 та 92,2 % відповідно. Вказані показники були співставні тим, що заявлені виробниками, та повністю задовольняли потребу для вирішенні завдань дослідження.

В той же час, відсутність достатньо широкого спектру експрес-тестів, крім діагностикумів на вірус грипу А та В, респіраторно-синцитіальний та аденовірус, не дозволяло в повній мірі досягти результатів поставленого завдання. Це спонукало нас до пошуку нових, високоспецифічних, чутливих та швидких методів діагностики вірусів респіраторної групи, які можуть бути застосовані як для поодиноких діагностичних досліджень, так і у великому їх потоці. Нашу увагу привернули молекулярно-біологічні методи, зокрема метод мультиплексної ПЛР у реальному часі.

На відміну від інших лабораторних методів (культуральних, імунологічних) мультиплексна ПЛР має безперечні переваги: високу специфічність, чутливість, універсальність процедури, простоту та зручність проведення аналізу, можливість одночасного виявлення відразу декількох патогенів, що в порівнянні з іншими методами дозволяє підвищити результативність діагностики на 20,0 % та вірогідно знизити відсоток негативних результатів з 93,0 до 45,0 % [29].

Для встановлення частоти ІЗ БА вірусної етіології та виявлення спектру основних вірусних етіологічних агентів проводили скринінгове вірусологічне і бактеріологічне обстеження усіх пацієнтів, що були включені у дослідження. За даними лабораторного обстеження 116 хворих — у 60 (51,7 ± 4,6) % ідентифікували вірусний етіопатоген, у 21 ((18,1 ± 3,6) %) хворого — бактеріальний етіопатоген і у 10 ((8,62 ± 2,6) %) хворих — вірусний та бактеріальний збудник.

За допомогою методу мультиплексної ПЛР ідентифікували 60 штамів вірусів та методом ІХА (швидкі тести

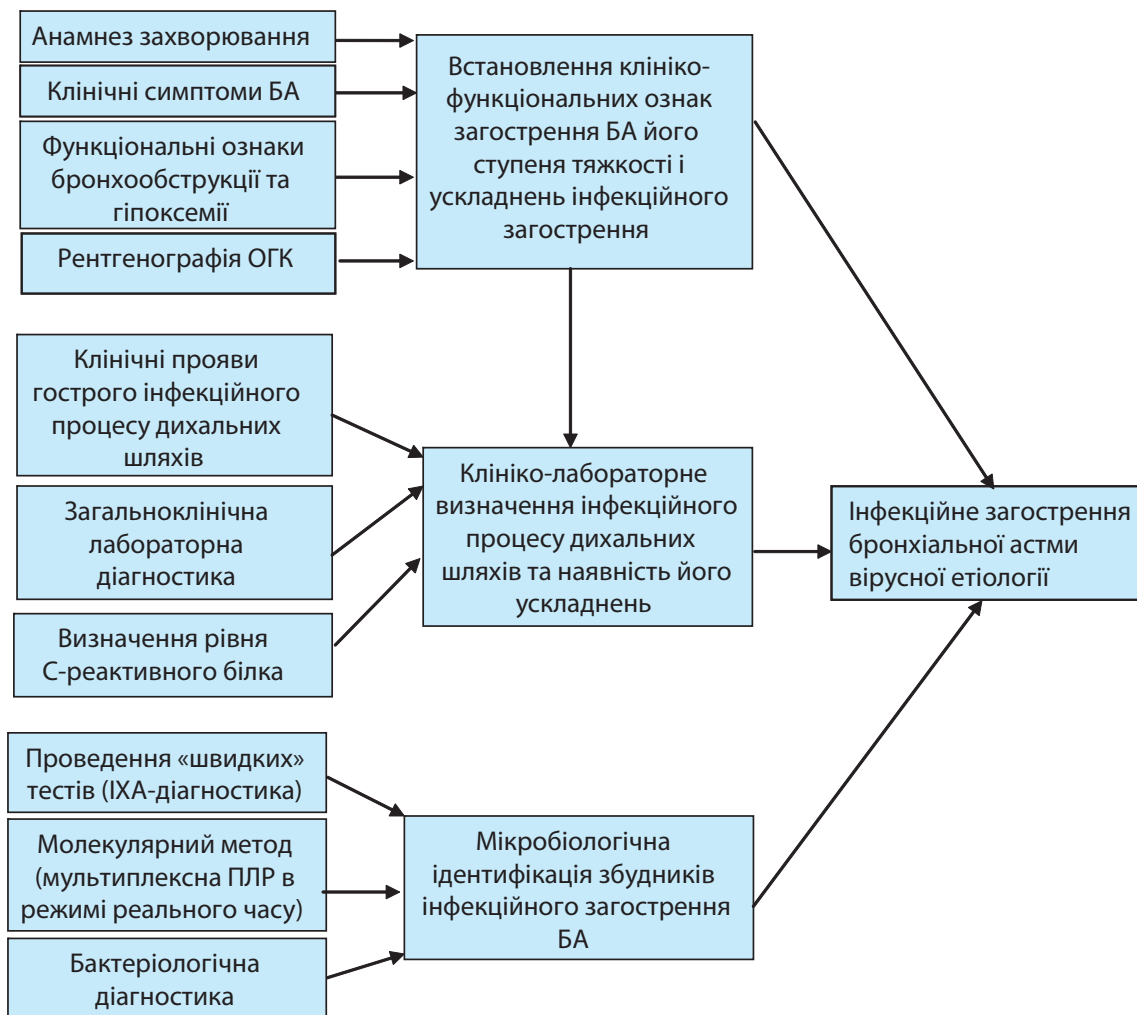


Рис. 1. Алгоритм діагностики інфекційного загострення БА вірусної етіології.

«CITO TEST INFLUENZA A+B», «RS-virus + Adenovirus») — 11 штамів (табл. 3.3). Найбільшу етіологічну значущість серед вірусних збудників мав риновірус — у  $(55,0 \pm 6,4)$  % випадків. Значно рідше виявляли бокавірус — у  $(10,0 \pm 3,9)$  % випадків; метапневмовірус — у  $(8,3 \pm 3,6)$  %; респіраторно-синцитіальний вірус — у  $(6,7 \pm 3,2)$  %, грипу А та Б — у  $(5,0 \pm 2,8)$  % кожний, корона-, аденовірус і вірус парагрипу — у  $(3,3 \pm 2,3)$  % випадків кожний (табл. 1).

Серед виділених бактеріальних штамів в значущому титрі визначили: *H. influenzae* — в  $(38,1 \pm 10,6)$  % випадків, *S. pneumoniae* — в  $(38,1 \pm 10,6)$  %, *M. catarrhalis* — в  $(14,3 \pm 7,6)$  %, *E. coli* і *S. aureus* — в  $(0,9 \pm 0,9)$  % кожний.

Для оцінки вираженості запальної реакції та проведення ранньої диференційної діагностики характеру запального процесу (вірусної або бактеріальної природи) використовували кількісне нефелометричне визначення рівня С-реактивного білка (СРБ) в сироватці або плазмі крові хворих з ІЗ БА.

Для доведення доцільності залучення в розроблений алгоритм діагностики ІЗ БА кількісного визначення СРБ провели моніторинг його рівня у 17 хворих з ІЗ БА. Дослідження проводили у вихідному стані (до початку лікування), на 7 та 14 добу спостереження (комплексного лікування). Всім відібраним хворим до комплексного лікування загострення додавали емпіричну протівірусну терапію (вітаглутам в дозі 90 мг. на день протягом 5

днів).

Як свідчать наведені в таблиці 2 дані, в усіх хворих з ІЗ БА у вихідному стані (до початку лікування) рівень СРБ достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищував такий групи контролю (практично здорові особи). Враховуючі літературні дані щодо рівня СРБ при різних патологіях [83], всі обстежені хворі були розподілені на початку спостереження на дві підгрупи: з рівнем СРБ нижче 30 мг/л — група 1 (12 хворих, середній рівень СРБ  $(15,6 \pm 1,2)$  мг/л) та 30 мг/л і більше — група 2 (7 хворих, середній рівень СРБ  $(43,8 \pm 3,3)$  мг/л).

Проведене обстеження в динаміці під час лікування (на 7-му та 14-ту добу спостереження) показало зниження рівня СРБ у більшості хворих групи 1, що свідчило про зменшення активності запалення та повністю співпадало з ознаками клінічної ефективності лікування.

У 2 хворих групи 1 на 7-му добу спостереження зафіксували зростання рівня СРБ, що вказувало на посилення активності запалення внаслідок недостатньої ефективності початкової терапії та/або розвитку у цих хворих бактеріального ускладнення (бронхіт, синусит). У хворих групи 2, у яких у вихідному стані, найбільш вірогідно, мало місце вірусно-бактеріальна інфекція, проти-запальна та емпірична протівірусна терапія до 7-го дня лікування не призвели до клінічного покращання та відповідного зменшення рівня СРБ, що послужило додатковим обґрунтуванням корекції лікування, зокрема при-

Таблиця 1

Частота ідентифікації вірусних збудників в матеріалі хворих з ІЗ БА за даними методів мультиплексної ПЛР та ІХА, %

Вірус	Кількість штамів, ідентифікованих за допомогою		Поширеність	
	мультиплексної ПЛР	ІХА («швидкі тести»)	серед хворих, % (n = 116)	серед штамів вірусів, % (n = 60)
Adenovirus	2	2	1,7 ± 1,2	3,3 ± 2,3
Bocavirus	6	—	5,2 ± 2,1	10,0 ± 3,9
Rhinovirus	33	—	28,5 ± 4,2	55,0 ± 6,4
Rhinovirus 1	—	—	—	—
Rhinovirus 2	—	—	—	—
Rhinovirus 3	—	—	—	—
Rhinovirus 4	1	—	0,9 ± 0,9	1,7 ± 1,7
Respiratory syncytial virus	4	3	3,4 ± 1,7	6,7 ± 3,2
Methapneumovirus	5	—	4,3 ± 1,9	8,3 ± 3,6
Corona virus	2	—	1,7 ± 1,2	3,3 ± 2,3
Corona virus WL-63229E	1	—	0,9 ± 0,9	1,7 ± 1,7
Corona virus НКІ-10С-42	1	—	0,9 ± 0,9	1,7 ± 1,7
Influenza A virus	3	3	2,6 ± 1,5	5,0 ± 2,8
Influenza B virus	3	3	2,6 ± 1,5	5,0 ± 2,8
Parainfluenza virus	2	—	1,7 ± 1,2	3,3 ± 2,3
Human Parainfluenza virus 1	—	—	—	—
Human Parainfluenza virus 2	—	—	—	—
Human Parainfluenza virus 3	2	—	1,7 ± 1,2	3,3 ± 2,3
Всього	60	11	51,7 ± 4,6	100,0

значення антибактеріальної терапії. На фоні скоригованої терапії у цих хворих до 14-го дня спостереження досягнуто достовірного зменшення рівня СРБ на фоні позитивної клінічної динаміки перебігу захворювання. Слід відзначити, що у всіх хворих з ІЗ БА наприкінці спостереження рівень СРБ зберігався дещо підвищеним (порівняно з контролем), що вказує на збереження запальної реакції в бронхах, як основного патогенетичного маркера БА.

Таким чином, визначення рівня СРБ в сироватці крові хворих на БА не тільки відображає інтенсивність запального процесу в бронхах, але може використовуватись для ранньої диференціальної діагностики бак-

## ЛІТЕРАТУРА

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2012) [Електронний ресурс]. — Режим доступу: [http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA\\_Report\\_2012.pdf](http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2012.pdf).
2. Наказ МОЗ України №128 від 19.03.2007 р. «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Ппульмонологія» [Текст]. — Київ : ТОВ «Велес», 2007. — 148 с.
3. Dulek Daniel, E. Viruses and asthma [Text] / E. Daniel Dulek, R. Monroe Carell // *Jr. Biochimica et Biophysica Acta*. — 2011. — № 2. — P. 1–10.
4. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission [Text] / P. A. Wark [et al.] // *Respirology*. — 2013. — V. 18 (6). — P. 996–1002.
5. Viral epidemiology of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. [Text] / G. Dimopoulos [et al.] // *Pulm Pharmacol*

Таблиця 2

Рівень СРБ у хворих з інфекційним загостренням бронхіальної астми, мг/л

Об'єкт спостереження	Вихідний стан	7-ма доба спостереження	14-та доба спостереження
Контроль (n = 9)	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	2,4 ± 0,2
Група 1 (n = 12)	15,6 ± 1,2 *	9,2 ± 1,8 *	5,7 ± 1,7 **
Група 2 (n = 5)	43,8 ± 3,3 *	40,2 ± 2,4 *	7,2 ± 3,3 **

Примітки: \* — достовірні відмінності між групами спостереження (контролем) (p < 0,05), # — достовірні відмінності в порівнянні з вихідним станом (p < 0,05).

теріального та вірусного запалення та оцінки адекватності лікування хворих з інфекційним загостренням бронхіальної астми.

## Висновки

В результаті проведення роботи був розроблений алгоритм діагностики вірус-індукованого загострення БА. Використання скринінгового вірусологічного обстеження пацієнтів за допомогою сучасних методів діагностики вірусних патогенів (імунохроматографічних експрес-тестів і полімеразної ланцюгової реакції) дало можливість підтвердити етіологічну роль вірусів при загостренні у 60 пацієнтів (51,7 ± 4,6) %. Швидкість, простота виконання, висока інформативність та відсутність потреби в додаткових коштовних реактивах та устаткуванні визначили перевагу швидких ІХА-тестів перед традиційними методами досліджень, однак відсутність достатньо широкого спектру експрес-тестів (доступні лише діагностикуми на вірус грипу А та В, респіраторно-синцитіальний та аденовірус) не дозволила в повній мірі відповісти на поставлені питання. Додаткове використання сучасного молекулярно-біологічного методу — мультиплексної ПЛР у реальному часі, значно розширило можливість отримання реальних результатів через свої безперечні переваги: високу специфічність, чутливість, універсальність процедури, простоту та зручність проведення аналізу, можливість одночасного виявлення відразу декількох патогенів.

Удосконалена схема діагностики ІЗ БА вірусної етіології шляхом додаткового кількісного нефелометричного визначення рівня С-реактивного протеїну сироватки крові, дозволило провести ранню диференціальну діагностику характеру запалення (бактеріального чи вірусного) у хворих на ІЗ БА та здійснити контроль ефективності проведеної терапії.

## REFERENCES

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2012). Available at: [http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA\\_Report\\_2012.pdf](http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2012.pdf).
2. *Ministerstvo okhorony zdorovya Ukrainy. Pro zatverdzhennya klinichnykh protokoliv nadannya medychnoy dopomogiza spetsialnistyu "Pulmonologiya". Nakaz № 128 vid 19.03.2007. Kyiv: Veles. 2007;146 s.* (Ministry of health of Ukraine. Approval of clinical protocols for provision of medical care. Decree # 128 dated 19.03.2007).
3. Dulek DE, Monroe CR. Viruses and asthma. *Jr. Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;2:1–10.
4. Wark PA, et al. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission. *Respirology*. 2013;18(6):996–1002.



- Ther. – 2012. – V. 25(1). — P. 8–12.
6. Murray, Clare S. Allergens, viruses, and asthma exacerbations [Text] / Clare S. Murray, A. Simpson, A. Custovic // Proceedings of the American Thoracic Society. — 2004. — Vol. 1, № 2. — P. 99–104.
  7. Wan, Tan C. Viruses in asthma exacerbations [Text] / Tan C. Wan // Current opinion in pulmonary medicine. — 2005. — Vol. 11, № 1. — P. 21–26.
  8. Gern, J. E. Infectious triggers of pediatric asthma [Text] / J. E. Gern, R. F. Lemanske // *Pediatr. Clin. North Am.* — 2003. — Vol. 50, № 3. — P. 555–575.
  9. The role of respiratory viruses in the origin and exacerbations of asthma [Text] / Nikolaos G. Papadopoulos [et al.] // Current opinion in allergy and clinical immunology. — 2003. — Vol. 3, № 1. — P. 39–44.
  10. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study [Text] / M. Morais-Almeida [et al.] // *J. Allergy Asthma Proc.* — 2007. — Vol. 28, № 2. — P. 183–189.
  11. Yamaya Mutsuo. Virus Infection-Induced Bronchial Asthma Exacerbation [Text] / Mutsuo Yamaya // *Pulmonary Medicine.* — 2012. — Vol. 1. — P. 1–14.
  12. Xepapadaki, P. Duration of postviral airway hyperresponsiveness in children with asthma: effect of atopy [Text] / P. Xepapadaki, N. G. Papadopoulos, A. Bossios // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2005. — Vol. 116, № 2. — P. 299–304.
  13. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma [Text] / G. Folkerts [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1998. — Vol. 151, № 5. — P. 1666–1673.
  14. Busse, W. W. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations [Text] / William W. Busse, R. F. Lemanske, J. E. Gern // *The Lancet.* — 2010. — Vol. 376, № 9743. — P. 826–834.
  15. Шевченко, О. П. Белки острой фазы воспаления [Текст] / О. П. Шевченко // *Лаборатория.* — 1996. — № 1. — 3–7.
  16. Pepys, M. B. C-reactive protein : a critical update [Text] / M. B. Pepys, G. M. Hirschfield // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111. — P. 1805–1812.
  17. High sensitivity C-reactive protein in asthma [Text] / M. Takemura [et al.] // *Eur. Respir. J.* — 2006. — Vol. 27 (5). — P. 908–912.
  18. Респираторная инфекция и роль сывороточных биомаркеров при обострении атопической бронхиальной астмы [Электронный ресурс] / Г. Э. Хаптахеева [и др.]. — Режим доступа: <http://www.pulmonology.ru/magazine/archive/2010/921/17442.php>
  19. Anderson, G. P. COPD, asthma and C-reactive protein [Text] / G. P. Anderson // *Eur. Respir. J.* — 2006. — Vol. 27. — P. 874–876.
  20. Вельков, В. В. С-реактивный белок — в лабораторной диагностике острых воспалений и в оценке рисков сосудистых патологий [Текст] / В. В. Вельков // *Клинико-лабораторный консилуим.* — 2008. — 2 (21). — С.37–48.
  21. Pate, V. B. C-reactive protein: A 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease [Text] / V. B. Pate, M. A. Robbins, E. J. Topol // *Cleveland Clinic. J. Med.* — 2001. — Vol. 88(6). — P. 521–534.
  22. Долгов, В. В. Лабораторная диагностика нарушений обмена белков [Текст]: учебное пособие / В. В. Долгов, О. П. Шевченко — Москва: РМАПО, КЛД, 2002. — 67 с.
  23. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб [Текст] : навчально-методичний посібник / І. В. Дзюблик [та ін.] ; Державна установа «Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика МОЗ України». — К. : НМАПО, 2012. — 200 с.
  24. *Медицина мікробіологія, вірусологія та імунологія* [Текст] : підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. / за ред. В. П. Широкова. — Видання 2-е. — Вінниця : Нова книга, 2011. — 953 с.
  25. *Посібник з медичної вірусології* [Текст] / В. М. Гирін [та ін.] ; за ред. В. М. Гиріна — Київ : Здоров'я, 1995. — 368 с.
  26. *Практические аспекты современной клинической микробиологии* [Текст] / Л. З. Скала [и др.] — М. : ТОО «ЛАБИНФОРМ», 1997. — 184 с.
  27. *Лабинская, А. С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований* [Текст] / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А. С. Ещина. — М.: Медицина, 2005.– С. 432–461.
  5. Dimopoulos G, et al. Viral epidemiology of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2012;25(1):8–12.
  6. Murray CS, Simpson A, Custovic A. Allergens, viruses, and asthma exacerbations. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2004;1(2):99–104.
  7. Wan TC. Viruses in asthma exacerbations. *Current opinion in pulmonary medicine.* 2005;11(1):21–26.
  8. Gern JE, Lemanske RF. Infectious triggers of pediatric asthma. *Pediatr. Clin. North Am.* 2003;50(3):555–575.
  9. Papadopoulos NG, et al. The role of respiratory viruses in the origin and exacerbations of asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology.* 2003;3(1):39–44.
  10. Morais-Almeida M, et al. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study. *J. Allergy Asthma Proc.* 2007;28(2):183–189.
  11. Yamaya M. Virus Infection-Induced Bronchial Asthma Exacerbation. *Pulmonary Medicine.* 2012;1:1–14.
  12. Xepapadaki P, Papadopoulos NG, Bossios A. Duration of postviral airway hyperresponsiveness in children with asthma: effect of atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005;116(2):299–304.
  13. Folkerts G, et al. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;151(5):1666–1673.
  14. Busse WW, Lemanske RF, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *The Lancet.* 2010;376(9743):826–834.
  15. Shevchenko OP. *Belki ostroy fazy vospaleniya* (Proteins of acute phase of inflammation). *Laboratoriya.* 1996;No 1:3–7.
  16. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein : a critical update. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1805–1812.
  17. Takemura M, et al. High sensitivity C-reactive protein in asthma. *Eur. Respir. J.* 2006;27(5):908–912.
  18. Khaptkhayeva GE. *Respiratornaya infektsiya i rol syvorotochnykh biomarkerov pri obostrenii atopicheskoy bronkhialnoy astmy* (Respiratory infection and the role of serum biomarkers in atopic asthma exacerbations). Available at: <http://www.pulmonology.ru/magazine/archive/2010/921/17442.php>
  19. Anderson GP. COPD, asthma and C-reactive protein. *Eur. Respir. J.* 2006;27:874–876.
  20. Velkov VV. *C-reaktivnyy belok — v laboratornoy diagnostike ostrykh vospaleniy i v otsenke riskov sosudystrykh patologiy* (C-reactive protein — in the laboratory diagnostics of acute inflammation and risk assessment vascular pathologies). *Kliniko-laboratornyy konsilium.* 2008;2(21):37–48.
  21. Pate VB, Robbins MA, Topol EJ. C-reactive protein: A 'golden marker' for inflammation and coronary artery disease. *Cleveland Clinic. J. Med.* 2001;88(6):521–534.
  22. Dolgov VV, Shevchenko OP. *Laboratornaya diagnostika narusheniya obmena belkov* (Laboratory diagnostics of disorders in protein metabolism). Moscow, RMAPO, KLD. 2002; 67 p.
  23. Dzyublyk IV, et al. *Polimerazna lantsyugova reaktsiya v laboratorniy diagnostytsi infektsiynykh khvorob* (Polymerase chain reaction in the laboratory diagnosis of infectious diseases). Kyiv, NMAPO. 2012;200 p.
  24. Shyrobokov VP. *Medychna mikrobiologiya, virusologiya ta imunologiya* (Medical microbiology, virology and immunology). Vynnytsya, Nova knyga. 2011; 953 p.
  25. Gyryn VM. *Posibnyk z medychnoy virusologiyi* (Manual of medical virology). Kyiv, Zdorovya. 1995; 368 p.
  26. Skala LZ, et al. *Prakticheskiye aspekty sovremennoy klinicheskoy mikrobiologii* (Practical aspects of modern clinical microbiology). Moscow, TOO "LABINFORM". 1997;184 p.
  27. Labinskaya AS, Blinkova LP, Eshchina AS. *Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya s tekhnikooy mikrobiologicheskikh issledovaniy* (Private medical microbiology with appliances microbiological studies). Moscow, Meditsina. 2005;432–461.