

Ю. О. Соломко

АЛГОРИТМ ЕТІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БОКАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПРИ ЗАГОСТРЕННІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ У ДІТЕЙ

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика

АЛГОРИТМ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БОКАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Ю. А. Соломко

Резюме

С целью разработки алгоритма этиологической диагностики бокавирусной инфекции было обследовано 74 ребенка в возрасте от 3 месяцев до 6 лет с обострением БА и с повторными эпизодами обструктивного бронхита. У 90,3 % больных с БА были выявлены респираторные вирусы. Бокавирусы человека заняли первое место в этиологической структуре заболеваний и были идентифицированы в 33,8 % случаев как моноинфекция и в 3 % как коинфекция с рино- и аденовирусами. Полученные данные были положены в основу разработки алгоритма этиологической диагностики, который включал в себя комплекс методов: детекцию вирусов гриппа А/В, РС-вируса, аденовирусов быстрыми тестами, полимеразную цепную реакцию в реальном времени в мультиплексном формате для идентификации бокавируса человека и других респираторных вирусов, и полимеразную цепную реакцию в реальном времени на атипичные возбудители. Алгоритм может быть рекомендован к широкому применению в педиатрической практике.

Ключевые слова: бокавирусная инфекция, бокавирусы человека, бронхиальная астма, диагностика, алгоритм.

Укр. пульмонолог. журнал. 2015, № 4, С. 27–31.

Соломко Юлія Олександрівна
Національна медична академія
післядипломної освіти імені П. Л. Шупика
Кафедра вірусології, аспірант
9, вул. Дорогожицька, 904112, м. Київ, Україна
Тел.: 38 093 995 34 77 doc.solomko@gmail.com

ALGORITHM OF ETIOLOGICAL DIAGNOSIS OF BOCAVIRUS INFECTION IN CHILDREN WITH ASTHMA EXACERBATION

Yu. O. Solomko

Abstract

In order to develop the algorithm of etiological diagnosis of bocavirus infection 74 children aged 3 months to 6 years with exacerbation of asthma and recurrent episodes of obstructive bronchitis were examined. In 90.3 % of patients with asthma respiratory viruses have been revealed. Human bocaviruses held first place in the etiological structure of diseases and in 33.8 % of cases were identified as a mono-infection and in 3 % as co-infection with rhino- and adenoviruses. These findings were the basis for development of the etiological diagnosis algorithm, which included a set of methods: detection of influenza A / B, RS-virus and adenovirus by rapid tests, real-time polymerase chain reaction in a multiplex format to identify human bocavirus and other respiratory viruses and real time polymerase chain reaction for atypical pathogens. The algorithm can be recommended for use in pediatric practice.

Key words: bocavirus infection, human bocavirus, bronchial asthma, diagnostics, algorithm.

Ukr. Pulmonol. J. 2015; 4: 27–31.

Yulia O. Solomko
National medical academy for advanced training
named after P. L. Shupik,
Department of virology, aspirant
9, Dorogozhytska str., 04112, Kyiv, Ukraine
Tel.: 38 093 995 34 77 doc.solomko@gmail.com

На сьогодні, бронхіальна астма (БА) залишається найпоширенішим хронічним захворюванням органів дихання серед дітей. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я на БА страждає близько 400 млн дітей у світі [1]. У розвинених країнах світу спостерігається зростання поширеності захворюваності та смертності на це хронічне захворювання у всіх дитячих вікових групах [2]. БА призводить до інвалідизації маленьких пацієнтів, завдає як матеріальної, так і соціальної шкоди [3]. Як хронічне захворювання, БА може супроводжуватися періодичними загостреннями [4]. До клінічних проявів інфекційного загострення БА відносяться прогресуюче наростання ядухи, що провокується тригерними механізмами, кашель, поява свистячих хрипів, відчуття нестачі повітря та стиснення грудної клітки чи різна комбінація цих симптомів [5, 6].

Клініко-епідеміологічні дослідження проведені в Європі підтверджують, що основними із тригерів загострення БА є респіраторні віруси. Показано, що до 85 % усіх загострень БА та епізодів wheezing у дітей етіологічно пов'язані з респіраторними вірусами [7, 8]. До них належать класичні збудники: віруси грипу А та В, віруси

парагрипу 1–4, риновіруси, респіраторні аденовіруси, респіраторно-синцитіальний вірус (РС-вірус), респіраторні коронавіруси людини, метапневмовірус. За період 2005–2010 роки були відкриті та частково охарактеризовані «нові» респіраторні віруси. Серед них особливе місце посів бокавірус людини.

Бокавірус людини (Human Bocavirus — HBoV) вперше був описаний групою шведських дослідників у 2005 році [9]. Збудник був ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у дітей з респіраторними захворюваннями. В якості клінічного матеріалу були досліджені носоглоткові змиви та аспірати дихальних шляхів. Ампліфіковані продукти ПЛР були відокремлені по вектору та сіквензовані. Виявлення послідовності вірусного геному, привело до розшифровки геному нового вірусу, що отримав назву HBoV-1 та був віднесений до родини *Parvoviridae*, підродини *Parvovirinae*, роду *Bocavirus*. За період з 2009 по 2010 роки рід *Bocavirus* розширився трьома новими представниками: HBoV-2, HBoV-3 та HBoV-4. Проведений філогенетичний аналіз показав, що HBoV-2 подібний до HBoV-1. Подібність для білків NS1, NP1, VP1/VP2 за складом амінокислот між двома вірусами становила відповідно 78 %, 67 % та 80 %. Проте, між вірусами була виявлена і певна розбіжність у будові геномів, що, вірогідно, і пояснює феномен відкриття

HBoV-2 лише через 4 роки поспіль від HBoV-1. В квітні 2009 року в Австралії був відкритий HBoV-3. Філогенетичний аналіз геному HBoV-3 виявив його близьку гомологію до HBoV-1 в області кодування білків NS1, NP1. HBoV-4 вперше був ідентифікований в 2010 році [10–12].

Можна стверджувати, що на сьогодні HBoV-1 має поширення в 28 країнах світу на п'яти континентах. Він був визнаний у всьому світі у зв'язку з захворюваннями верхніх і нижніх дихальних шляхів у дітей. Встановлено, що в етіологічній структурі ГРВІ дитячого населення Європи HBoV-1 займає одне з перших місць. Так, у Франції та в Іспанії в етіологічній структурі гострих респіраторних захворювань дітей за останні 2–3 роки HBoV-1 займає третє місце, поступаючись лише РС-вірусу та риновірусам. У Фінляндії HBoV-1 посідає четверте місце в структурі ГРВІ у дітей після риновірусів, ентеровірусів та РС-вірусу. Є повідомлення про те, що HBoV-1 викликають загострення БА у дітей переважно раннього віку, а частота його виявлення коливається за даними різних авторів в межах 6–46 % випадків [13, 14]. Остаточна роль інших бокавірусів у виникненні загострень БА продовжує з'ясовуватись.

Запорукою ефективної етіотропної терапії при інфекційному загостренні БА є ефективна лабораторна діагностика, спрямована на виявлення та ідентифікацію збудника, що є етіологічним чинником загострення. Вірусологічна діагностика HBoV-1 в країнах Європи базується на комплексному використанні різних високотехнологічних методів, серед яких — молекулярно-генетичні та серологічні методи дослідження. Найбільш частим та надійним методом ідентифікації HBoV-1 в клінічних зразках є класична ПЛР, заснована на ампліфікації висококонсервативних ділянок геному HBoV-1, а саме: NS1 та NP1 [15]. Використовуються методи ПЛР, які дозволяють провести ампліфікацію та детекцію HBoV-1 в режимі реального часу менш ніж за 2 години. Інтенсивний метод для простої та швидкої диференціації 2 генотипів HBoV в клінічних матеріалах запропонували німецькі вчені. В їх модифікації тест ПЛР включає ампліфікацію фрагменту VP1/VP2 гена HBoV із 309 пар основ з наступною інкубацією отриманої ДНК з ендонуклеазою Bst API [16].

Методи серологічної діагностики, спрямовані на визначення специфічних гуморальних антитіл до бокавірусів. Зразки сироватки крові тестують методом імуноблотингу з використанням 2 рекомбінантних капсидних антигенів HBoV-1: VP1 та VP2. Такий підхід дозволяє виявити антитіла класів Ig M та Ig G [17].

Даних щодо застосування класичних вірусологічних методів виділення та ідентифікації бокавірусів, методу флюорисціюючих антитіл або імуноферментного аналізу немає. Нерозв'язаним залишається питання систематизації та оптимізації спільного використання як вже розроблених діагностичних підходів, так і нових, здатних підвищити інформативність обстеження пацієнта та визначати одночасно збудників бактеріальної та вірусної природи. Тому одним із основних завдань лабораторної діагностики бокавірусної інфекції при захворюваннях органів дихання стає створення алгоритму

діагностики, який би регламентував перелік та послідовність виконання досліджень.

Метою роботи була розробка алгоритму етіологічної діагностики бокавірусної інфекції при загостренні БА у дітей перших 6 років життя.

Матеріали та методи дослідження

У дослідження було включено 74 дитини віком від 3 місяців до 6 років, протягом двох місяців. Серед них хлопчиків було 47 (63,5 %), дівчаток — 27 (36,5 %). Серед обстежених, 62 дитини, що хворіли на БА та 12 дітей з повторними епізодами обструктивного бронхіту. Діти обстежувалися та проходили лікування в стаціонарі НДСЛ «ОХМАТДИТ» протягом 2012–2013 років.

Залучення дітей у дослідження відбувалося з урахуванням критеріїв включення та виключення. Діти, які приймали участь у дослідженні, та їх батьки були проінформовані про план проведення дослідження, його мету та методи, що було заплановано використовувати. Батьки маленьких пацієнтів дали письмову інформовану згоду згідно вимог Good Clinical Practice та діючого законодавства України про питання біоетики медичних досліджень (Наказ МОЗ України № 66 від 13.02.2006 року «Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і типового положення про комісію з питань етики»). Верифікація діагнозів та лікування дітей проводилися згідно з відповідними протоколами.

Для виявлення бокавірусів та інших респіраторних вірусів проводився забір біоматеріалу у вигляді мазка з носової порожнини. Забір мазків для молекулярно-генетичних досліджень здійснювали сухими, стерильними велюр-тампонами виробництва компанії «Сорап» (Італія). Відібраний біоматеріал поміщали в універсальне транспортне середовище виробництва компанії «Сорап» (Італія). Зберігання та транспортування відібраних зразків здійснювали відповідно вимог методичних рекомендацій «Порядок відбору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» Наказу МОЗ України № 662 від 30.07.2013 року [18]. Дослідження проводили в молекулярно-генетичній лабораторії кафедри вірусології НМАПО імені П. Л. Шупика.

Екстракцію нуклеїнових кислот (НК) із проб біоматеріалу здійснювали за допомогою набору реагентів NucleoSpin Dx Virus (Seegene, Німеччина). Зворотну транскрипцію здійснювали набором cDNA Synthesis Premix V1.1 (Seegene, Німеччина).

Для ідентифікації бокавірусів та основних респіраторних вірусів, що можуть бути тригерами інфекційного загострення БА або обструктивного бронхіту використовували метод ПЛР в режимі реального часу в мультиплексному форматі [19]. Для ампліфікації застосовували набір реагентів «Amplicon™ II RV 16» (Seegene, Німеччина), даний набір дозволяв одночасно виявляти 16 вірусних збудників в одній пробірці, таких як: віруси грипу A+B (Human Influenza Virus A&B), респіраторно-синцитіальний вірус (Human Respiratory Syncytial Virus — HRsV), риновірус (Human Rhinovirus — HRV), метапневмовірус (Human

Metapneumovirus — HMPV), віруси парагрипу 1, 2, 3, 4 типів (Human Parainfluenza Virus 1–4 — HPIV 1-4), коронавіруси 229-E, NL-63, OC-43 (Human Coronavirus — HCoV), аденовіруси В, С, Е (Human Adenovirus В, С, Е — HAdV) та бокавірус людини (Human Bocavirus — HBoV-1). Результати дослідження враховували за допомогою приладу CFX96 (Bio-Rad, США).

Наявність атипичних збудників *Mycoplasma pneumoniae* і *Chlamydia pneumoniae* у біологічному матеріалі визначали за допомогою ПЛР в реальному часі. Застосовували набір реагентів з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією «АмпліСенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*-FL».

В дослідженні для індикації основних респіраторних вірусів використовували швидкі тести «Cito Test Influenza A&B», «Cito Test ADENO RESPI» та «Cito Test RSV Blister» виробництва «Фармаско» (Україна). Матеріалом для дослідження служили мазок з носу та/або носоглоткові змиви, відібрані в перші 48 годин. Процедура тестування здійснювали відповідно до інструкції тестів та методичних рекомендацій [20]. Облік результатів здійснювали візуально через 10–15 хвилин.

Використовували також швидкі тести «Streptococcus pneumonia Antigen Test Kit», «Legionella Urinary Antigen Test Kit» (Alere Scarborough, Inc., USA) на наявність у сечі антигену *S. pneumoniae* і *L. pneumophila* відповідно.

Статистичну та математичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою ліцензійної програми пакету Statistica for Windows 6.1.

Результати

За допомогою ІХА-швидких тестів було обстежено 74 дитини. В групі дітей з БА (n = 64) в біологічному матеріалі було виявлено антигени до вірусу грипу А у 5 осіб (8,0 % випадків), респіраторних аденовірусів — у 4 осіб (6,5 %) та РС-вірусів — у 5 осіб (8,0 %). В групі дітей з повторними епізодами обструктивного бронхіту (n = 12) ситуація була наступною: респіраторні віруси були виявлені у 6 дітей: у 4 дітей було встановлено антигени вірусу грипу А, у 2 осіб — антигени аденовірусів та РС-вірусу. Антигени вірусу грипу В не були виявлені. Загальна ефективність діагностики швидкими тестами в цілому у 74 осіб склала 27 %.

Результати швидких тестів на наявність у сечі антигенів атипичних бактеріальних збудників виявилися негативними в усіх випадках. Дані, отримані швидкими тестами, повністю відповідали даним молекулярно-генетичних досліджень. У жодному випадку атипичні збудники виявлені не були.

За даними молекулярно-генетичного дослідження на респіраторні віруси за допомогою методу ПЛР в режимі реального часу були обстежені 62 дитини із загостренням БА у 56 було виявлено вірусну природу загострення. Частота виявлення HBoV-1 в етіологічній структурі ГРВІ наведена на рисунку 1.

3 лютого 2012 по березень 2013 років було виявлено HBoV1 типу у вигляді моноінфекції у 21 хворого (33,8 % випадків), РС-вірус — у 9 хворих (14,5 %), вірус грипу А (H1N1) сезонний — у 9 хворих (14,5 %). Аденовіруси трьох груп В, С, Е були виявлені у 7 хворих (11,2 % випадків), коронавіруси штамів NL-63, OC-43 — у 4 хворих

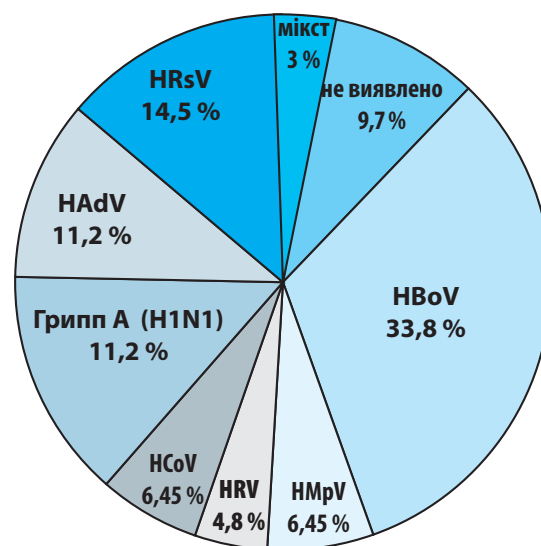


Рис. 1. Частота виявлення HBoV-1 в етіологічній структурі ГРВІ.

(6,45 % випадків), метапневмовірус — 4 хворих (6,45 %), риновіруси — у 3 хворих (4,8 %). У 2-х хворих були виявлені випадки коінфекції HBoV1+аденовірус та HBoV1+риновірус.

12 дітей з повторними епізодами обструктивного бронхіту HBoV у вигляді моноінфекції було виявлено у 5 хворих, вірус грипу А (H1N1) сезонний — у 2 хворих, аденовіруси трьох груп В, С, Е були виявлені у 3 хворих, інші респіраторні віруси не виявлялися. Також, у жодного хворого не було виявлено коінфекцію.

Таким чином, ефективність етіологічної діагностики методом ПЛР в реальному часі в мультиплексному форматі на 16 збудників склала 90,3 %, що в 3,3 рази вище ніж при застосуванні тільки швидких тестів ($p < 0,05$).

Важливо підкреслити, що застосування ПЛР в мультиплексному форматі в реальному часі дозволило, крім бокавірусів, ще одночасно виявити добре відомі основні збудники захворювань органів дихання та ідентифікувати «нові» віруси, які не виявляються іншими, в тому числі серологічними та класичними вірусологічними методами.

В результаті проведеного дослідження нами був побудований алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції, який включав кроки, позначені на рисунку 2.

Крок 1. Біологічний матеріал від хворого бажано отримати до початку курсу етіотропної терапії в перші 2 доби після звернення хворого до стаціонару.

Крок 2. Тестування з використанням швидких тестів можна проводити біля ліжка хворого, в прийнятному відділенні, в маніпуляційному кабінеті або в умовах лабораторії. Застосування сучасних швидких тестів для індикації бактеріальних та вірусних агентів дозволяє отримати результат в дуже короткий термін (за 10–15 хвилин) та своєчасно розпочати етіотропну терапію.

Крок 3. Для ПЛР дослідження біологічний матеріал (мазок із носа) відбирають окремо сухими стерильними велюр-тампонами та поміщають в пробірки з транспортним середовищем, що надається фірмою-виробником

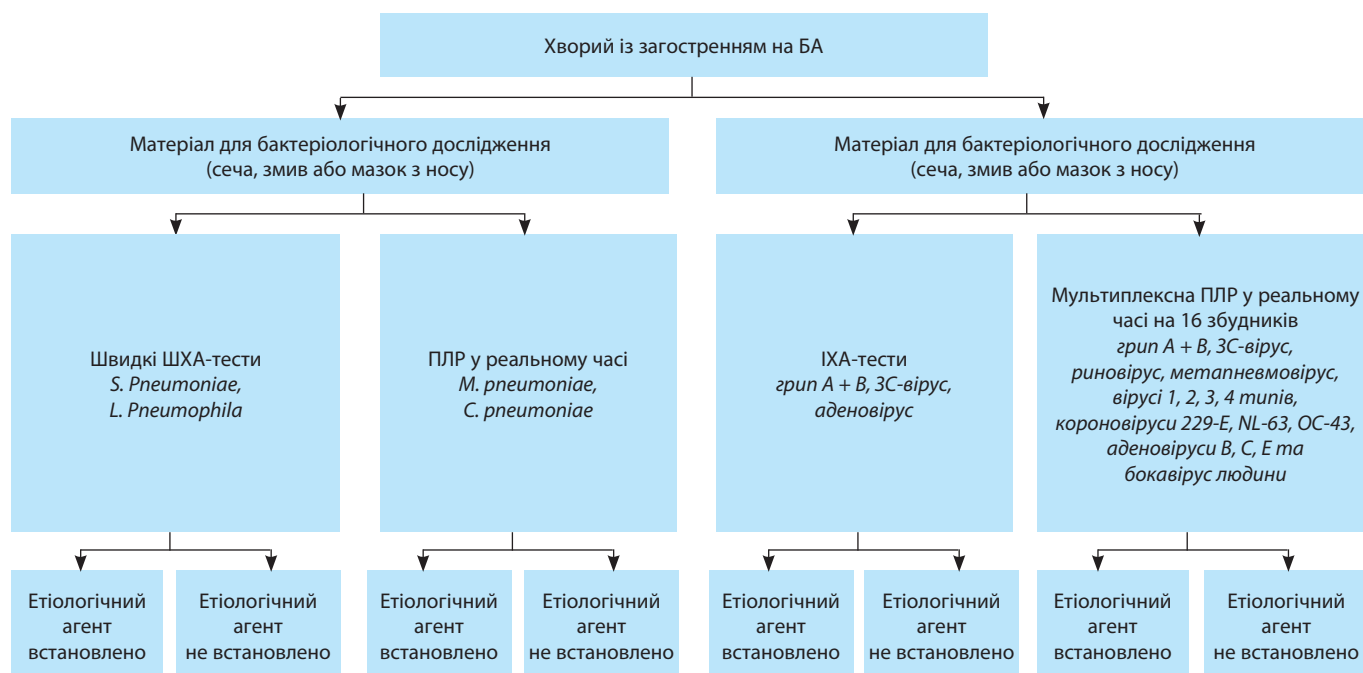


Рис. 2. Алгоритм етіологічної діагностики бокавірусної інфекції.

тест-системи для безпечного і якісного зберігання. Транспортування зразків до молекулярно-генетичної лабораторії відбувається з дотриманням холодового ланцюга в день відбору біоматеріалу.

Крок 4. Для діагностики бокавірусної інфекції доцільно застосовувати ПЛР в реальному часі в мультиплексу форматі для одночасного визначення не тільки бокавірусу, але й інших респіраторних вірусів з метою виявлення можливого ко-інфікування бокавірусів з риновірусами, з аденовірусами тощо.

Крок 5. Для виявлення бактеріальних атипичних збудників доцільно застосовувати ПЛР в реальному часі в форматі на один, або на 2–3 збудники.

Молекулярно-генетичні дослідження на основі ПЛР на сьогодні — основний метод, що дозволяє ідентифікувати бокавіруси людини. Наявні в Україні молекулярно-генетичні лабораторії різного виду підпорядкування здатні забезпечити етіологічну діагностику інфекційного загострення БА у дітей, тому розробка ефективного алгоритму діагностики є своєчасною на сьогодні.

Запропонований алгоритм забезпечує реалізацію двох різних методичних підходів — індикацію антигенів респіраторних вірусних та бактеріальних агентів та детекцію геномної ДНК/РНК збудників. За першого підходу застосовуються сучасні високочутливі та високоспецифічні швидкі тести. За другого підходу — молекулярно-генетичні методи. Включення до алгоритму діагностики бокавірусної інфекції у дітей віком до 6 років високотехнологічної мультиплексної ПЛР в реальному часі у комплексі з швидкими тестами дозволяє не тільки ідентифікувати бокавірус людини, але й виявити випадки коінфекції з іншими збудниками вірусної або бактеріальної природи.

Висновок

Запропонований алгоритм дозволяє встановити наявність бокавірусної інфекції при загостренні БА та значно підвищити ефективність етіологічної діагностики у дітей. Алгоритм може бути рекомендований до широкого застосування в педіатричній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

- Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014 [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <http://www.ginastma.org>.
- Охотникова, Е. Н. Острые респираторные вирусные инфекции у детей и их роль в развитии вирус-индуцированной бронхиальной астмы [Текст] / Е. Н. Охотникова, И. В. Дзюблик, С. Н. Руденко // Ж. Педиатрия. Восточная Европа. — Беларусь. — 2013. — № 3. — С.118–127.
- Weinstein, C. Comparative Effectiveness and Health Care Spending — Implications for Reform Milton [Text] / C. Weinstein, A. Jonathan, N. Skinner // Engl. J. Med. — 2010. — Vol. 362. — P. 460–465.
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2009 [Електронний ресурс]. — Режим доступу. — <http://www.ginastma.org>.
- Douglas, J. A. What Determines Asthma Phenotype? Respiratory infections and asthma. [Text] / J. A. Douglas, E. R. O'hehir // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2000. — Vol. 161. — № 3. — P. 211–214.
- Фещенко, Ю. І. Бронхообструктивні захворювання у дорослих осіб: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, лікування: навчальний посібник [Текст] / Ю. І. Фещенко. — 2015. — С. 73–124.
- Carrol, K. N. The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbation [Text] / K. N. Carrol // Immunol. Allergy Clin. North Am. — 2008. — Vol. 28 (3). — P. 539–561.
- Allander, T. Human bocavirus and acute wheezing in children [Text] / T. Allander, T. Jartti, S. Gupta et al. // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 44. — P. 904–910.

REFERENCES

- Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014. Available at: <http://www.ginastma.org>.
- Okhotnikova YeN, Dzyublik IV, Rudenko SN. Ostryye respiratornyye infektsii u detey i ikh rol v razvitiy virus-indutsirovannoy bronkhialnoy astmy (Acute respiratory viral infection in children and their role in the development of virus-induced asthma). Zh. Pediatriya. Vostochnaya Evropa. 2013;No 3:118–127.
- Weinstein C, Jonathan A, Skinner N. Comparative Effectiveness and Health Care Spending — Implications for Reform Milton. Engl. J. Med. 2010;362:460–465.
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2009. Available at: <http://www.ginastma.org>.
- Douglas JA, O'hehir ER. What Determines Asthma Phenotype? Respiratory infections and asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000;161(3):211–214.
- Feshchenko Yul. Bronkhoobstruktyvni zakhvoryuvannya u doroslykh osib: etiologiya, patogegez, klasyfikatsiya, diagnostyka, lakuvannya: navchalnyy posibnyk (Broncho-obstructive disease in adults: etiology, pathogenesis, classification, diagnosis, treatment: study guidelines). 2015;73–124.
- Carrol KN. The impact of respiratory viral infection on wheezing illnesses and asthma exacerbation. Immunol. Allergy Clin. North Am. 2008;28(3):539–561.
- Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. Clin. Infect. Dis. 2007;44:904–910.
- Allander T, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005;102(36):12891–12861.

9. Allander, T. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [Text] / T. Allander et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2005. — Vol. 102(36). — P. 12891–12861.
10. Kapoor, A. A newly identified bocavirus species in human stool [Text] / A. Kapoor et al. // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 199(2). — P. 196–200.
11. Arthur, J. L. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children [Text] / J. L. Arthur et al. // *P. Lo. S. Pathog.* — 2009. — Vol. 5 (4). — P. e1000391.
12. Обертинська, О. В. Бокавіруси та захворювання, що вони викликають: структура та систематика збудника, епідеміологія, клінічні прояви, особливості лікування та методи діагностики [Текст] / О. В. Обертинська, Ю. О. Бойко // *Зб. наук. праць НМАПО.* — 2014. — 23 (3). — С. 626–641.
13. Monteny, M. Human bocavirus in febrile children, The Netherlands [Text] / M. Monteny // *Emerg. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 13(1). — P. 180–182.
14. Jacques, J. Human bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis [Text] / J. Jacques. // *J. Clin. Virol.* — 2008. — Vol. 43 (2). — P. 142–147.
15. Lu, X. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens [Text] / X. Lu, M. Chittaganpitch, S. J. Olsen, I. M. Mackay // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44 (9). — P. 3231–3235.
16. Kleines, M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol [Text] / M. Kleines // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45, № 3. — P. 1032–1034.
17. Kantola, K. Serodiagnosis of human bocavirus infection [Text] / K. Kantola // *J. Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 46 (4). — P. 547–549.
18. Наказ МОЗ України № 662 від 30.07.2013 року «Про затвердження Методичних рекомендацій "Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції"» [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua>
19. Дзюблик, І. В. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб [Текст] / І. В. Дзюблик, Н. Г. Горovenko // *Навчально-методичний посібник.* — Київ, 2012. — С. 19–21.
20. Дзюблик, І. В. Швидкі ІХА-тести для етіологічної діагностики інфекційних захворювань людини: методичні рекомендації [Текст] / І. В. Дзюблик. — 2013. — С. 34–41.
10. Kapoor A, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J. Infect. Dis.* 2009;199(2):196–200.
11. Arthur JL, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *P. Lo. S. Pathog.* 2009;5(4):e1000391.
12. Obertynska OV, Boyko YuO. *Bokavirusy ta zakhvoryuvannya, shcho vony vyklykayut: struktura ta systemetyka zbudnyka, epidemiologiya, klinichni proyavy, osoblyvosti likuvannya ta metody diagnostyky* (Bocaviruses and diseases they cause: structure and taxonomy of the pathogen, epidemiology, clinical manifestations, treatment peculiarities and diagnostic methods). *Zb. nauk. prats NMAPO.* 2014;23(3):626–641.
13. Monteny M. Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 2007;13(1):180–182.
14. Jacques J. Human bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *J. Clin. Virol.* 2008;43(2):142–147.
15. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM. Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(9):3231–3235.
16. Kleines M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(3):1032–1034.
17. Kantola K. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *J. Clin. Infect. Dis.* 2008;46(4):547–549.
18. *Nakaz MOZ Ukrainy №662 мше 30.07.2013 року «Pro zatverdzhennya Metodychnykh rekomendatsiy «Poryadok zaboru, transportuvannya ta zberigannya materialu dlya doslidzhennya metodom polimeraznoyi lantsyugovoyi reaktsiyi»»* (Decree of MOH of Ukraine from 07.30.2013 № 662 "On Approving the Guidelines" Procedure for the collection, transportation and storage of material for research by polymerase chain reaction "). Available at: <http://www.moz.gov.ua>
19. Dzyublik IV, Gorovenko NG. *Polimerazna lantsyugova reaktsiya v laboratorniy diagnostytsi infektsiynykh khvorob* (Polymerase chain reaction in the laboratory diagnosis of infectious diseases). Kyiv. 2012;19–21.
20. Dzyublik IV. *Shvydki IXA-testy dlya etiologichnoyi diagnostyky infektsiynykh zakhvoryuvan lyudyny: metodychni rekomendatsiyi* (IHA rapid tests for etiologic diagnosis of infectious human diseases: guidelines). 2013;34–41.