

# ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ РОТАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

*І.В. Дзюблик, О.П. Трохименко, О.В. Ковалюк, С.Г. Вороненко*

*Київська медична академія післядипломної освіти*

**Резюме.** Наведені сучасні принципи та методи лабораторної діагностики ротавірусної інфекції, представлені алгоритми проведення досліджень у людей різних вікових груп. Особливу увагу приділено використанню сучасних методів швидкої діагностики цієї інфекції із застосуванням високочутливих і специфічних тест-систем, які не потребують застосування високовартісної апаратури та матеріалів, що дуже важливо в умовах практичної вірусологічної лабораторії. Значну увагу приділено оцінці та інтерпретації результатів досліджень, отриманих внаслідок використання цих методів.

**Ключові слова:** ротавірусна інфекція, лабораторна діагностика.

## ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

*И.В. Дзюблик, Е.П. Трохименко, Е.В. Ковалюк, С.Г. Вороненко*

**Резюме.** Приведены современные принципы и методы лабораторной диагностики ротавирусной инфекции, представлены алгоритмы проведения исследований у людей разных возрастных групп. Особое внимание уделено применению современных методов быстрой диагностики этой инфекции с использованием высокочувствительных и специфических тест-систем, которые не требуют применения дорогостоящей аппаратуры и материалов, что очень важно в условиях практической вирусологической лаборатории. Значительное внимание уделено оценке и интерпретации результатов исследований, полученных вследствие использования этих методов.

**Ключевые слова:** ротавирусная инфекция, лабораторная диагностика.

## LABORATORY DIAGNOSTIC OF ROTAVIRUS INFECTION, PRINCIPLES AND METHODS

*I.V. Dzyublyk, O.P. Trohimenko, O.V. Kovaluk, S.G. Voronenko*

**Summary.** In the article were adduced laboratory diagnostics of rotavirus infection, modern principles, methods and algorithm of essay in different age-related groups were represented. Special attention was given on using modern methods of express-diagnostics of this infection with using highly sensitive and specific test-systems, which are requires availability of expensive equipment and materials, what's very important in conditions of applied virology laboratory. Focused one's attention on appraisal and understanding of investigation results, which were taking in consequence of using this methods.

**Key words:** rotavirus infection, laboratory diagnostic.

### Адреса для листування:

*Дзюблик Ірина Володимирівна  
01112, Київ, вул. Дорогожицька, 9  
Київська медична академія післядипломної  
освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України*

Ротавірусна інфекція і в XXI столітті залишається складною медико-соціальною проблемою. Це зумовлено, в першу чергу, її значною поширеністю, досить високими показниками захворюваності та смертності, а також суттєвими економічними втратами внаслідок цього захворювання. За даними ВООЗ щорічно в світі реєструється до 125 млн випадків ротавірусної інфекції, з яких 600–900 тис. закінчуються летально, що становить практично одну чверть від усіх смертельних випадків серед хворих на діарею. У США у дітей віком від 1 до 4 років реєструється понад 1 млн випадків тяжких ротавірусних діарей, з яких 125–150 випадків на рік закінчуються летально. За даними російських вчених, в РФ щорічно реєструється близько 2 млн випадків гострих кишкових інфекцій (ГКІ), з яких майже 15% — ротавірусні гастроентерити. Ротавірусна інфекція займає провідне місце в структурі ГКІ у

м. Мінську та має постійну тенденцію до зростання: від 189,3 (1994 р.) до 467,5 (2001 р.) на 100 000 дитячого населення. В 2001 р. в дитячій інфекційній клінічній лікарні м. Мінська знаходилась на лікуванні 1521 дитина з ротавірусною інфекцією, що відповідно складало 10,7% від усіх госпіталізованих та 47,1% в структурі ГКІ.

В Україні питома вага ротавірусного гастроентериту в структурі ГКІ у дітей рік від року зростає. Різка підвищення захворюваності на ротавірусний гастроентерит реєструється у зимовий період і особливо тривало утримується на високому рівні у віковій групі 1–3 роки. Спалах ротавірусної інфекції 2001 р. в Одесі, фактором передачі якої була питна вода, із залученням до епідемічного процесу великої кількості людей різних вікових груп, висвітлив такі проблеми: забруднення природних вод у ряді регіонів України ротавірусами, існування загрози виникнення нових спалахів та

актуальність широкого впровадження в практику лабораторної діагностики цієї інфекції.

Сучасна лабораторна діагностика ротавірусної інфекції передбачає використання великого арсеналу вірусологічних методів та методів експрес-діагностики, нових діагностичних препаратів та тест-систем. Проте їх кількість та діагностична цінність постійно змінюються. Одні з них відходять у минуле, інші — удосконалюються або вперше впроваджуються. Крім того, вибір методу та ефективність лабораторної діагностики багато в чому залежать від матеріально-технічного забезпечення лабораторії, кваліфікації та досвіду персоналу.

### ПРИНЦИПИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ РОТАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Сучасна лабораторна діагностика ротавірусної інфекції ґрунтується на трьох підходах:

- безпосереднє дослідження клінічного матеріалу за допомогою методів експрес-діагностики на наявність маркерів ротавірусної інфекції: ротавірусів, їх антигенів та вірусної РНК;
- виділення ротавірусів із клінічного матеріалу та їх ідентифікація;
- серологічна діагностика, що ґрунтується на визначенні 4-разового підвищення титрів специфічних антиротавірусних антитіл.

У зв'язку з цим усі відомі методи лабораторних досліджень умовно можна розділити на 3 групи: експресні, вірусологічні та серологічні.

Гострий початок та короткий перебіг ротавірусної інфекції зумовлюють необхідність застосування в першу чергу експресних методів лабораторної діагностики. Раннє встановлення етіологічного діагнозу, безумовно, допоможе клініцистам (педіатрам, інфекціоністам, неонатологам) в призначенні курсу лікування, спеціальної дієти тощо. Більш того, швидка діагностика ротавірусної інфекції дозволить вчасно ізолювати хворого та здійснити інші відповідні протиепідемічні заходи для попередження поширення інфекції в дитячих колективах, лікувальних установах тощо. Більшість наведених далі методів лабораторної діагностики дозволяють здійснити етіологічну діагностику та отримати відповідь протягом 24 год.

Традиційні методи серологічної діагностики (реакція нейтралізації (РН) та реакція гальмування непрямой гемаглютинації (РГНГА)) мають на сьогодні значення лише для ретроспективного встановлення діагнозу. Деякі серологічні реакції, які також застосовували з цією метою, такі, як гальмування гемаглютинації (РГГА) та реакція зв'язування комплементу (РЗК), на сьогодні практично не використовують.

Вірусологічні методи застосовують для виділення та ідентифікації ізолюваних ротавірусів у культурі клітин в присутності трипсину. Проте в умовах практичної вірусологічної лабораторії вони мають обмежене застосування у зв'язку з

великими труднощами при культивуванні ротавірусів людини, їх значною тривалістю (на постановку витрачається майже 1 міс) та високою вартістю досліджень.

### ВІДБІР, ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ КЛІНІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Ротавірус з'являється у фекаліях вже через 15–20 год після інфікування людини. На початку розвитку клінічних ознак ротавірусної інфекції (на 1–3-й день захворювання) спостерігається максимум екскреції ротавірусів з фекаліями, що складає  $10^{10}$  –  $10^{12}$  вірусних часток на 1 г. Тому фекальні маси є основним матеріалом для лабораторного дослідження. Їх відбирають тільки в стерильний посуд (стерильні пеніцилінові флакони) або у спеціальні контейнери з обов'язковим дотриманням правил асептики. Відібраний матеріал зберігають впродовж 24 год при температурі 4 °С. За необхідності більш тривалого зберігання температурний режим має становити -6 – -20 °С.

Фекалії, призначені для дослідження з використанням методів електронної мікроскопії, зберігають тільки при температурі 4 °С. **Їх багаторазове заморожування та розморожування є неприпустимим.**

За неможливості одержати проби фекальних мас використовують ректальні тампони, які змочують вірусним транспортним середовищем (ВТС) і вводять у пряму кишку обертальним рухом, після чого вміщують у флакони з ВТС.

За необхідності підтвердження етіології ротавірусного гастроентериту з летальним кінцем для дослідження відбирають секційний матеріал. Для цього з дотриманням правил асептики відбирають шматочки уражених ділянок тонкого кишечника, які вміщують у стерильні флакони з ВТС, розчином Хенкса чи середовищем 199 (рН 7,4–7,7), до яких додають антибіотики (пеніцилін — 1000 ОД/мл, стрептоміцин — 1000 мкг/мл). Флакони щільно закривають стерильними гумовими пробками і маркують. До відправки в лабораторію матеріал зберігають при температурі -20 °С.

Транспортування досліджуваного матеріалу до лабораторії слід здійснювати з дотриманням правил безпеки в спеціальному термоконтейнері з охолоджувачими елементами.

### ПІДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Фекалії.** Готують 10% суспензію фекальних мас. Для цього в пеніцилінові флакони відбирають 1 г фекалій і додають 9 мл 0,9% розчину NaCl, розчину Хенкса або підтримуючого культурального середовища. Флакони щільно закривають, обгортають марлевою серветкою, змоченою 3% розчином хлораміну, і струшують впродовж 10 хв. Залежно від того, за допомогою якого методу передбачається проводити лабораторну діагностику ротавірусної інфекції, методика подальшої обробки 10% суспензії фекалій розрізняється.

У разі проведенні діагностики методами РНГА та імуноферментного аналізу (ІФА) 10% суспензію

фекалій освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв впродовж 10 хв. Надосад відбирають і залишають на ніч при температурі 4 °С або заморожують.

При підготовці фекалій для дослідження методом реакції латекс-аглютинації (РЛА) готують їх 10% суспензію на відповідному буферному розчині, що входить до складу тест-системи. Для цього до 0,25 г фекалій додають 2,5 мл буферного розчину. Суспензію інтенсивно струшують (наприклад, на струшувачі типу «vortex» впродовж 1 хв) та освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв.

При постановці ІФА суспензію фекалій на розчині Хенкса з додаванням антибіотиків (пеніциліну — 1000 ОД/мл, стрептоміцину — 1000 мкг/мл) освітлюють центрифугуванням при 2000 об/хв протягом 20 хв і зберігають у замороженому вигляді. Розморожені проби для ІФА використовують протягом 1 тиж.

**Секційний матеріал.** Фрагменти тонкого кишечника масою 1 г промивають 2–3 рази охолодженим розчином Хенкса з антибіотиками (пеніциліну — 1000 ОД/мл, стрептоміцину — 1000 мкг/мл), переносять у стерильну чашку Петрі, подрібнюють, розтирають у стерильній фарфоровій ступці з додаванням стерильного піску та сольового розчину, отримуючи 10% суспензію. Для підвищення виходу антигенів вірусу з клітин гомогенат тричі заморожують і розморожують. Суспензію центрифугують при 3000–4000 об/хв впродовж 10 хв. Надосад переносять у стерильні флакони. За необхідності проводять повторне центрифугування при 6000 об/хв протягом 20 хв при температурі 4 °С.

**Сироватка крові.** Для отримання сироватки у хворих натще беруть 1 мл венозної або капілярної крові, яку вмішують у суху стерильну пробірку. Пробірку з кров'ю витримують у термостаті при температурі 37 °С впродовж 30 хв. Згусток відокремлюють від стінок пробірки, сироватку крові відділяють центрифугуванням і переносять у чисту пробірку. Зберігають сироватку при температурі 4 °С впродовж 48 год без додавання консервантів. За необхідності більш тривалого зберігання температура має становити -20 °С.

### МЕТОДИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ РОТАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

**Електронна мікроскопія (ЕМ) та імунна електронна мікроскопія (ІЕМ).** Першим, а згодом еталонним, методом лабораторної діагностики ротавірусної інфекції стала ЕМ. Це єдиний метод лабораторного дослідження, який дозволяє візуально виявити та ідентифікувати ротавірус в клінічному матеріалі за морфологічними ознаками. Для приготування препарату на предметну сітку, вкриту вуглецево-формваровою плівкою-підкладкою, наносять підготовлену суспензію фекалій, що містить вірус. Після негативного контрастування фосфорно-вольфрамовою кисло-

тою або уранілформіатом препарати досліджують при інструментальному збільшенні у 30–50 тис. разів. Належність виявлених часток до ротавірусів визначають за характерними морфологічними ознаками та розміром. Одним із варіантів ЕМ є ІЕМ. Вона дає можливість не тільки ідентифікувати ротавірус у матеріалі хворого за його морфологічними ознаками, але й підтвердити етіологію захворювання, ґрунтуючись на результатах взаємодії специфічних антитіл з вірусом. **ЕМ та ІЕМ частіше застосовують в умовах спеціалізованих вірусологічних лабораторій науково-дослідних інститутів.**

**Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА).** В умовах практичної вірусологічної лабораторії РНГА є найбільш традиційним методом лабораторної діагностики ротавірусної інфекції. Її успішно застосовують за необхідності обстеження як великої кількості хворих, так і 1–5 осіб. Постановку РНГА здійснюють протягом 3 год.

Принцип РНГА полягає в тому, що попередньо оброблені формаліном або таніном еритроцити (частіше людини або барана), на поверхні яких сорбовані специфічні антитіла або антигени (сенсibilізовані еритроцити), у присутності гомологічного антигену (або антитіл) утворюють агрегати, що проявляється феноменом аглютинації. Метод є високочутливим (виявляє 1–2 нг білка) і специфічним (вище 93%). РНГА застосовують для виявлення антигену ротавірусів безпосередньо в фекаліях хворих на гострий гастроентерит або в секційному матеріалі.

**Метод досить простий у виконанні, не потребує використання складного обладнання та апаратури і може бути застосований у будь-якій вірусологічній або бактеріологічній лабораторії!**

Для проведення РНГА з метою лабораторної діагностики ротавірусної інфекції розроблений цілий ряд еритроцитарних діагностиків. Серед них дуже добре зарекомендували себе тест-системи: «Імунодіагностикум еритроцитарний ротавірусний сухий для реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) і реакції гальмування непрямой гемаглютинації» та «Ротатест». Залежно від того, антитілами чи антигенами сенсibilізовані еритроцити, розрізняють відповідно антитільні або антигенні діагностикуми. Тест-системи, до складу яких входять відповідні діагностикуми, призначені для виявлення і кількісного визначення титрів ротавірусів (здебільшого групи А) та специфічних антитіл у досліджуваних матеріалах.

**До складу тест-систем для РНГА входять, як правило, три компоненти:**

- 1) діагностикум еритроцитарний рідкий (ЕД) — 1% суспензія еритроцитів барана, сенсibilізованих імуноглобуліновою фракцією асцитної рідини білих шурів, імунізованих ротавірусом мавп SA-11;
- 2) імуна асцитна рідина (ІАР) білих шурів, імунізованих ротавірусом мавп SA-11;
- 3) антиген ротавірусу (АГ) мавп SA-11.

Реакцію проводять у мікропланшетах для імунологічних реакцій в об'ємі 75 мкл. До кожної лунки двох рядів мікропланшета вносять по 25 мкл стабілізованого 0,9% розчину NaCl. По 25 мкл підготовленого відповідним чином клінічного матеріалу додають у перші лунки вказаних рядів, після чого готують його послідовні дворазові розведення (від 1:2 до 1:256). Далі в лунки першого ряду додають по 25 мкл 0,9% розчину NaCl, а в лунки другого ряду — по 25 мкл ІАР. Планшет струшують та залишають при кімнатній температурі на 20 хв для утворення комплексу антиген–антитіло в лунках другого ряду. Після цього в усі лунки вносять по 25 мкл ЕД. Планшет знову струшують і залишають на 1,5–2 год для специфічної взаємодії АГ ротавірусу з антиротавірусними імуноглобулінами ЕД. Реакція супроводжується такими видами контролю: перший — контроль неспецифічної аглютинації ЕД (в 3 лунки вносять по 50 мкл 0,9% розчину NaCl та додають по 25 мкл ЕД в кожну); другий — контроль специфічної взаємодії ЕД та ІАР. Його виконують за вищеописаною методикою РНГА, використовуючи замість досліджуваної проби АГ ротавірусу, який титрують від 1:64 до 1:2048. Антиген входить до складу тест-системи у розведенні 1:32. Цей контроль проводять після отримання комплексу, а потім — за необхідністю.

Облік результатів в контролях: в першому — спонтанна аглютинація ЕД має бути відсутня, в другому — в першому ряду ЕД повинен реагувати з антигеном у розведенні не нижче ніж 1:256, а в другому ряду ІАР повинна знижувати титр АГ не менше ніж в 4 рази.

Позитивним результат щодо наявності ротавірусу вважається у випадку повного гальмування аглютинації в другому ряду РНГА не менше ніж на 2 розведення (в 4 рази) в порівнянні з першим рядом.

Слід відзначити, що проведення обох видів контролю є обов'язковим при одержанні нової тест-системи. У разі їх невідповідності тест-система вважається непридатною для застосування та повертається виробнику.

**Реакція латекс-аглютинації (РЛА).** РЛА набула поширення у зв'язку з посиленням в останні роки тенденції до використання латексів в якості неспецифічного носія антигенів (антитіл). Латекси — це полістиролові глобули із стандартним розміром часток (близько 0,8 мкм), що більш стабільні, ніж еритроцити, і підлягають стандартизації. За чутливістю та специфічністю РЛА мало чим відрізняється від РНГА і також ґрунтується на феномені аглютинації. Принцип методу полягає в тому, що частки латексу, сенсibilізовані специфічними антитілами, набувають здатності до аглютинації в присутності ротавірусних антигенів.

**Метод є чутливим і високоспецифічним, швидким (РЛА триває впродовж 2–5 хв) та простим у виконанні, зручним для рутинних діагностичних**

**досліджень в умовах практичної вірусологічної лабораторії.**

На сьогодні на світовому ринку представлений великий вибір комерційних тест-систем для діагностики ротавірусної інфекції на основі РЛА. **До їх складу входять:** буферний розчин для розведення клінічного матеріалу, суспензія часток латексу, сенсibilізованих антиротавірусними імуноглобулінами, суспензія латексу для негативного контролю, антиген для позитивного контролю, пластинки для постановки реакції, одноразові палички для змішування. Підготовку клінічного матеріалу проводять за методом, описаним вище.

Чутливість РЛА знижується при дослідженні з діагностичною метою матеріалів, отриманих після 5–7-го дня хвороби. Постановку реакції та візуальний облік результатів здійснюють згідно з інструкцією до тест-системи.

**Імуноферментний аналіз (ІФА).** Особливе місце у діагностиці ротавірусної інфекції в умовах практичної вірусологічної лабораторії посідає імуноферментний аналіз. Він ґрунтується на застосуванні зв'язаних з ферментом специфічних антитіл або антигенів. Це імунохімічний аналіз, при якому імунологічну реакцію використовують для виявлення та кількісного визначення вірусних антигенів або специфічних антитіл.

ІФА — високочутливий та специфічний метод, відносно простий у виконанні, дозволяє досліджувати одночасно велику кількість проб, використовуючи повністю або частково автоматизовані системи, не потребує додаткової очистки чи збагачення (концентрації) проб. Сьогодні на світовому ринку представлений великий вибір комерційних тест-систем для діагностики ротавірусної інфекції за допомогою ІФА. Здебільшого вони призначені для виконання ІФА в прямому варіанті. У разі детекції ротавірусних антигенів перший компонент реакції (антитіла) сорбують на тверду фазу (полістиролові планшети, кульки, палички). Наступні компоненти: 10% освітлену суспензію фекалій; антитіла, зв'язані з ферментом — пероксидазою хрому (кон'югат); хромоген та субстрат (перекис водню) вносять поетапно, інкубують і відмивають згідно з інструкцією. Ферментативну реакцію розкладу субстрату зупиняють кислотою. Облік результатів проводять згідно з інструкцією при відповідній довжині хвилі за допомогою спектрофотометра (рідера). За інтенсивністю забарвлення реакційної суміші визначають ферментативну активність утвореного в результаті реакції комплексу, що пропорційна початковій концентрації антигену ротавірусу в досліджуваному матеріалі. Постановку ІФА та облік результатів здійснюють згідно з інструкцією до тест-системи.

**Електрофорез (ЕФ) вірусних РНК у поліакриламідному гелі (ПААГ) або в агарозі.** Принцип методу полягає в ідентифікації ротавірусів методом ЕФ у ПААГ за вірусними геномними РНК-сегментами. Виділення РНК ротавірусу

можна проводити безпосередньо із фекалій, минаючи стадію очищення та концентрації вірусу. Цей метод, крім виявлення (індикації) РНК ротавірусів, надає ще й цінну інформацію про електрофоретип циркулюючих вірусів, що дозволяє вважати його зручним для епідеміологічного моніторингу ротавірусної інфекції. **Метод особливо важливий на сучасному етапі для лікарів-епідеміологів.**

Дослідження клінічного матеріалу за допомогою методу ЕФ у ПААГ триває 24–36 год. Візуалізацію результатів розділення РНК на 11 геномних сегментів проводять в ультрафіолетових променях. В умовах практичної вірусологічної лабораторії цей метод може застосовуватись за наявності спеціального обладнання — апаратів для електрофорезу.

**Виявлення віруспецифічних РНК методом гібридизації (дот-гібридизація).** Принцип методу полягає в гібридизації мічених зондів нуклеїнових кислот з денатурованою віруспецифічною нуклеїновою кислотою, фіксованою на носії (частіше на нітроцелюлозних фільтрах). Метод є чутливим та високоспецифічним і може застосовуватись у спеціалізованих вірусологічних лабораторіях за наявності відповідного обладнання та реактивів.

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).** Завдяки високій чутливості та специфічності ПЛР, або реакція ампліфікації генів, активно впроваджується в практику охорони здоров'я з метою діагностики інфекційних захворювань, у тому числі вірусних інфекцій. ПЛР призначена для виявлення в клінічному матеріалі фрагментів послідовностей геному збудника при багаторазовому збільшенні (ампліфікації) кількості цих фрагментів з подальшим ідентифікуванням їх за допомогою відомих методів — молекулярної гібридизації або ЕФ в агарозному гелі чи ПААГ. Принцип ПЛР полягає у багаторазовому повторенні циклів синтезу віруспецифічної послідовності ДНК за допомогою термостабільного ферменту Таq ДНК-полімерази та двох специфічних затравок — праймерів.

Лабораторна діагностика ротавірусної інфекції за методом ПЛР із зворотною транскрипцією (транскриптазно опосередкована ампліфікація) включає чотири етапи: виділення вірусної РНК з клінічного матеріалу (слини, суспензії фекалій, мазків, секційного матеріалу), зворотну транскрипцію віруспецифічної ДНК на матриці вірусної РНК, ампліфікацію послідовностей цієї ДНК та детекцію одержаних ампліфікатів методом електрофорезу в агарозному гелі або ПААГ.

ПЛР-діагностика ротавірусної інфекції можлива за наявності певного набору приміщень, що відповідають «Правилам функціонального устрою та експлуатації приміщень лабораторії молекулярно-генетичних досліджень», згідно з «Методичними рекомендаціями по проведенню робіт в діагностичних лабораторіях, які вико-

ристовують метод полімеразної ланцюгової реакції» (1995), високовартісного обладнання та діагностичних наборів. Крім того, методика проведення ПЛР є досить складною і на сьогодні недостатньо уніфікованою для застосування в умовах практичної вірусологічної лабораторії.

**Реакція гальмування непрямой гемаглютинації (РГНГА).** З метою серологічної діагностики досліджують парні сироватки крові хворого. Виявляють сероконверсію або підвищення титру антиротавірусних антитіл у 4 рази. Першу сироватку одержують на початку захворювання (у гострий період), другу — через 2–4 тиж після взяття першої. Для лабораторного підтвердження наявності гострої ротавірусної інфекції виявляють також IgM у сироватці крові пацієнта в перші дні захворювання.

Суть методу полягає у специфічному гальмуванні антиротавірусними антитілами, що наявні в сироватці крові хворого, непрямой гемаглютинації ротавірусного антигену. При проведенні РГНГА використовують АГ в робочому розведенні, що містить 4 АО в 25 мкл, яке визначають шляхом попереднього титрування ротавірусного антигену з тест-системи згідно з інструкцією. Досліджувані сироватки крові розводять 1:10 0,9% розчином NaCl та звільняють від неспецифічних інгібіторів гемаглютинації шляхом прогрівання при температурі 65 °С впродовж 20 хв. Для дослідження кожної сироватки використовують 1 ряд лунок планшета. В планшеті для імунологічних реакцій проводять дворазові розведення досліджуваних сироваток в 0,9% розчині NaCl в об'ємі 25 мкл. В усі лунки з розведеннями досліджуваних сироваток додають по 25 мкл робочої дози АГ. Планшет струшують і залишають на 20 хв при кімнатній температурі для утворення комплексу АТ досліджуваної сироватки з ротавірусним АГ. Після цього в лунки вносять по 25 мкл ЕД. Планшети струшують і залишають на 1,5–2 год для осідання еритроцитів. Облік результатів проводять, як зазначено в інструкції, при обов'язковому проведенні відповідних контролів.

При виборі будь-якого методу лабораторної діагностики ротавірусної інфекції на результати досліджень впливають своєчасний та правильний відбір, зберігання і транспортування клінічного матеріалу. Дуже важливими чинниками є правильна підготовка матеріалу та вибір алгоритму дослідження. Так, наприклад, у новонароджених, у яких діарея за лічені години може призвести до фатального кінця внаслідок розвитку інтоксикації та зневоднення організму, досліджуваний матеріал слід відбирати якомога раніше (у перші години захворювання). При цьому необхідно застосовувати тільки експресні методи лабораторної діагностики — визначення антигенів ротавірусів безпосередньо у фекаліях. Для лабораторної діагностики ротавірусної інфекції у новонароджених та у дітей до 2 років слід застосовувати алгоритм № 1 (додаток 1).

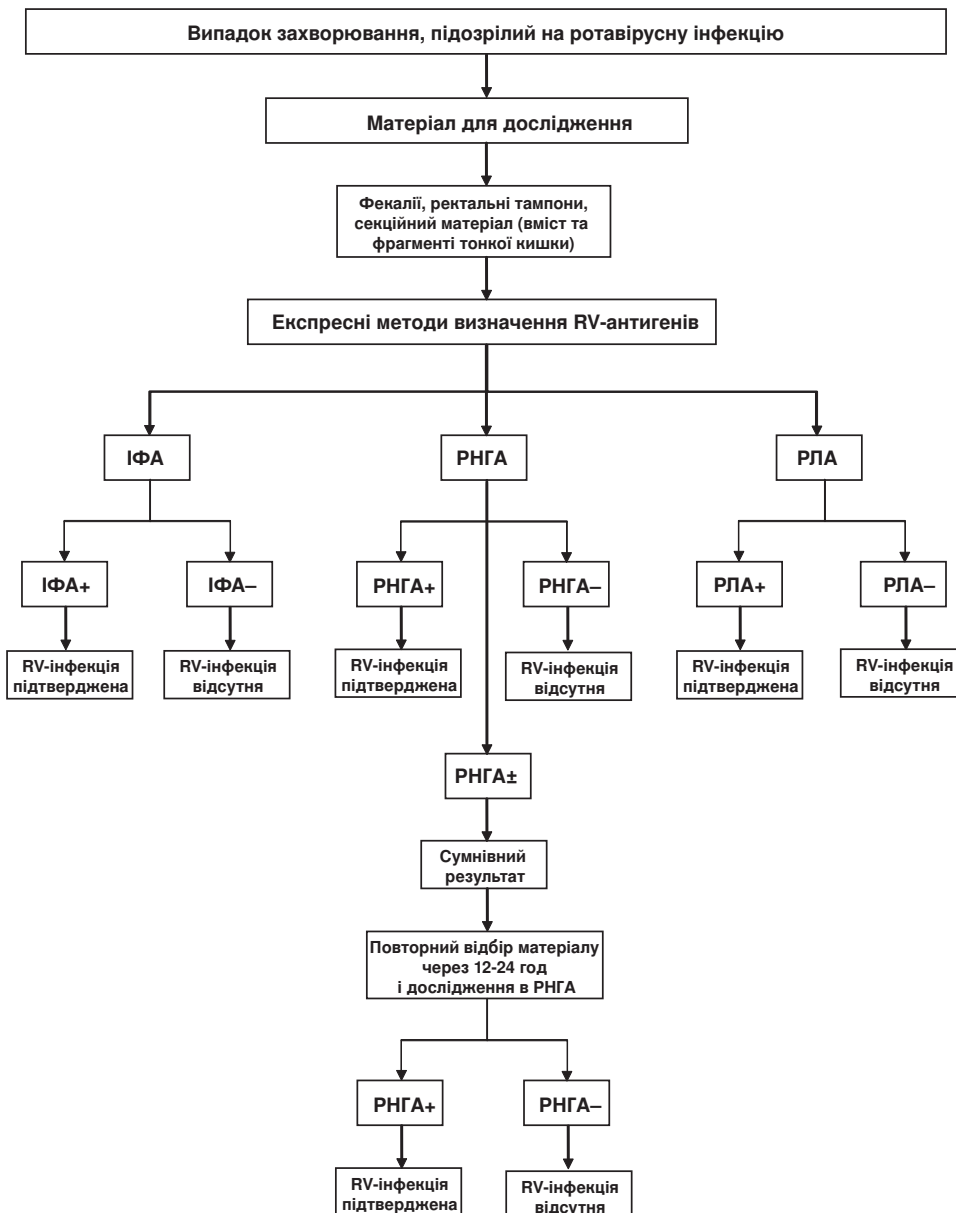
У дітей віком старше 2 років та у дорослих можна застосовувати алгоритм № 2 (додаток № 2), до якого, поряд з експресними, входять серологічні методи діагностики. У цьому алгоритмі враховується той факт, що вже з перших днів захворювання у відповідь на ротавірусну інфекцію в крові з'являються специфічні ранні антитіла класу IgM, титр яких досягає максимальних значень на 10–14-й день від початку захворювання, а через 6–10 тиж вони вже не виявляються. Пізні антитіла класу IgG з'являються у крові наприкінці першого тижня хвороби, титр їх досягає максимальних значень через 3–4 тиж і, поступово знижуючись, зберігається впродовж 40 тиж і більше. Враховуючи динаміку антитілоутворення, для серологічної діагностики сироватку крові відбирають двічі: в гострий період та в період реконвалесценції (через 2–3 тиж від початку захворювання).

## ЛІТЕРАТУРА

- Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. (2000) Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция. Лань, С. СПб, 272 с.
- Гирін В.М., Дзюблик І.В. (1998) Ротавірусний гастроентерит (лекція). Укр. мед. часопис, 2(4): 146–150.
- Ключарева А.А., Раевнев А.Е., Малякко Д.В., Панько О.А. (2000) Ротавирусная инфекция у детей. Мед. газета, 18.02.2000.
- Минков И.П., Михайлова А.М., Борисова Г.А., Иванова Л.А., Юрченко И.В. (2001) Клиника, диагностика и лечение ротавирусной инфекции у детей. Перинатология та педіатрія, 4: 29–33.
- Носик Н.Н., Стаханова В.М. (2000) Лабораторная диагностика вирусных инфекций. Клиническая микробиология и антимикроб. химиотерапия, 2(2): 70–78.
- Учайкин В.Ф. (2002) Руководство по инфекционным болезням у детей. ГЭОТАР-МЕД, Москва, 808 с.
- Alan D. Lopez (2000) Reducing child mortality. Bulletin of the World Health Organization, 10(78): 1173–1174.

## Додаток 1

## Алгоритм лабораторної діагностики ротавірусної інфекції у новонароджених та у дітей до 2 років



Алгоритм лабораторної діагностики ротавірусної інфекції у дітей старше за 2 роки та у дорослих

