

## 16. Вирусни инфекции

### 16.1. Вирус на човешкия имунен дефицит (HIV)

Изследванията за HIV в България са регулирани с наредби издадени от Министерството на здравеопазването.

#### 16.1.1. Въведение

HIV вирусите са класифицирани в два типа (HIV-1 и HIV-2), отделно от това има групи и субтипове на базата на геномните им характеристики. HIV-1 е РНК вирус с геном, състоящ се от 3 основни гена, кодиращи капсидни протеини (gag p55, p24, p17), обратна транскриптаза, протеаза, интеграза (*pol* p66, p51, и p31) и обвиващи гликопротеини (*env* gp160, gp120, gp41). HIV-1 е категоризиран в групите (M, N, O и P), като M е най-често срещаната група (CLSI, 2011; Branson, B. et al, 2014). HIV-1 е разпространен повсеместно, а HIV-2 се среща в предимно в Западна Африка.

#### 16.1.2. Прозоречен период при изследванията за HIV

Прозоречен период е времето от момента на инфектиране до момента, в който може да се открие маркер за HIV инфекция.

Данните за прозоречния период за различните маркери са съгласно тестове одобрени от Администрацията по храните и лекарствата в САЩ - Food and Drug Administration (FDA) (Dodd, R., 2002; CDC, 2018).

- HIV РНК в плазмата може да се открие с PCR най-рано 10–12 дни след датата на инфекция.
- HIV p24 антиген в серум или плазма може да се открие със серологичен тест най-рано 15-17 дни след датата на инфекция.
- HIV-специфични антитела може да се открият в серум или плазма със серологичен тест най-рано 21 дни след датата на инфекция.

#### 16.1.3. Основни видове тестове за HIV

- **Скринингови тестове за HIV**

Скрининговите тестове за HIV са два вида: лабораторни тестове и бързи тестове.

- **Лабораторни скринингови тестове**

Съвременните лабораторни скринингови тестове за HIV са 4-та или 5-та генерация (Alexander, T. S., 2016). И 4-та и 5-та генерация тестове за HIV се базират на откриването на HIV p24 антиген и HIV-специфични антитела и имат еднаква чувствителност. Разликата в двете генерации, е че при изследване с 4-та генерация тест се получава един сумарен резултат, а при 5-та генерация се получават два отделни резултата – един за p24 антиген и един за HIV-специфични антитела.

- **Бързи скринингови тестове**

Бързите тестове за HIV могат да бъдат различни видове и да откриват само един маркер - HIV-специфични антитела или два маркера - HIV p24 антиген и HIV-специфични антитела. Прозоречният период на бързите тестове е по-дълъг от лабораторните тестове и за точна информация относно времето на прозоречния период на конкретния тест, трябва да се направи справка с производителя на тестовете.

**За клинични цели трябва да се използват лабораторни скринингови тестове, но това не изключва успоредното изследване и с бързи скринингови тестове за бърза справка.**

Изследванията за HIV за клинични цели трябва да се провеждат с одобрен за употреба антиген/антитяло 4-та или 5-та генерация тест, който открива HIV-1 и HIV-2 антитела и p24 антиген, за да може да бъде открита и остра HIV инфекция. Ако резултатите са

отрицателни не се изисква по-нататъшно изследване на пробите, които са дали отрицателен резултат при първоначалното изследване. Ако има вероятност за много скорошна инфекция и прозоречен период за вида на проведеното изследване трябва да се изпълни изследване с тест за нуклеинова киселина с PCR или да се поиска нова кръвна проба след няколко седмици и да се повтори изследването.

#### **16.1.4. Потвърдително изследване за HIV**

При получаване на реактивен резултат при изследване за HIV се изпраща проба в Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV за извършване на потвърдително изследване съгласно действащата „Наредба № 47 от 11 декември 2009 г. за условията и реда за изследване, съобщаване и отчет на заразеност с вируса на синдрома на придобитата имунна недостатъчност, издадена от Министерството на здравеопазването обн. ДВ. бр.103 от 29 декември 2009 г., изм. ДВ. бр.5 от 14 януари 2011 г.“ Справки могат да се правят в Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV на телефон: 029318071. Потвърдителните изследвания за HIV се извършват с потвърдителни тестове. В процеса на диагностициране може да се използват набор от тестове, които откриват различни маркери за HIV. Златният стандарт за потвърждаване на HIV инфекция е Уестърн блот, с който се доказва наличието на репертоар от специфични анти-HIV-антитела към различни вирусни елементи. Съвременната модификация на потвърдителния Уестърн блот тест е Line immunoassay test (LIA-test). LIA тестовете не са произведени от нативен вирусен лизат, а са на базата на рекомбинантни протеини и синтетични пептиди от HIV-1, HIV-2 и HIV-1 група O, които са фиксирани в отделни линии върху стрипове с пластмасова подложка.

Изследванията за HIV трябва да се извършват съгласно нормативните документи и приетите наредби в страната: „Наредба № 47 от 11 декември 2009 г. за условията и реда за изследване, съобщаване и отчет на заразеност с вируса на синдрома на придобитата имунна недостатъчност, издадена от Министерството на здравеопазването обн. ДВ. бр.103 от 29 декември 2009 г., изм. ДВ. бр.5 от 14 януари 2011 г.“ ; “Наредба № 21 от 2005 г. за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести, последна редакция и изменение ДВ брой: 5, от дата 15.1.2019 г.“; „Заповед № РД 01-83/17.03.2016 г. на Министъра на здравеопазването - Методическо указание за профилактика на предаването на ХИВ инфекция от майка на дете“; „Заповед № РД - 01-201/10.07.2018 г. на Министъра на здравеопазването - Методическо указание за антиретровирусно лечение и мониторинг на възрастни лица с HIV-инфекция“.

Допълнителни съображения и внимание трябва да се приложат при изследванията на възрастни, новородени деца, лица на пост-експозиционна профилактика, лица на пре-експозиционна профилактика, при остра HIV инфекция със сероконверсия и при други състояния, при които резултатите от стандартния алгоритъм на изследване може да покаже неочаквани и нетипични находки. Не съществува един единствен тест, който е 100% сигурен, тестовете могат да бъдат фалшиво положителни и/или не достатъчно чувствителни и при различни състояния и находки от стандартните лабораторни изследвания, може да се наложи да се проведат разширени изследвания с допълнителни методи за анализ и с нови кръвни проби.

Справки относно потвърдителните изследвания и изискванията за съхранение и транспорт на пробите могат да се правят в Националната референтна потвърдителна лаборатория по HIV на телефон: 029318071 или на сайта на Националния център по заразни и паразитни болести: [https://www.ncipd.org/index.php?option=com\\_k2&view=item&id=68:hiv-spin&Itemid=1095&lang=bg](https://www.ncipd.org/index.php?option=com_k2&view=item&id=68:hiv-spin&Itemid=1095&lang=bg)

## Литература

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Criteria for laboratory testing and diagnosis of human immunodeficiency virus infection; approved guideline. CLSI document M53-A. Wayne, PA: CLSI, 2011.
2. Branson, B. M., Owen, S. M., Wesolowski, L. G., Bennett, B., Werner, B. G., Wroblewski, K. E., & Pentella, M. A. (2014). Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection: updated recommendations.
3. Dodd, R. Y., E. P. Notari IV, and S. L. Stramer. "Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window- period risk in the American Red Cross blood donor population." *Transfusion* 42.8 (2002): 975-979.
4. Delaney, Kevin P., et al. "Time until emergence of HIV test reactivity following infection with HIV-1: implications for interpreting test results and retesting after exposure." *Clinical infectious diseases* (2016): ciw666.
5. Bennett, B., Chavez, P., Gaynor, A., Masciotra, S., Owen, M., Parker, M., ... & Wesolowski, L. G. (2019). Suggested reporting language for the HIV laboratory diagnostic testing algorithm.
6. Centers for Disease Control and Prevention. (2016). Technical Update on HIV-1/2 Differentiation Assays.
7. Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Quick reference guide: recommended laboratory HIV testing algorithm for serum or plasma specimens.
8. Alexander, T. S. (2016). Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin. Vaccine Immunol.*, 23(4), 249-253.

## Наредби касаещи изследванията за HIV в България

- Наредба № 47 от 11 декември 2009 г. за условията и реда за изследване, съобщаване и отчет на заразност с вируса на синдрома на придобитата имунна недостатъчност, издадена от Министерството на здравеопазването обн. ДВ. бр.103 от 29 декември 2009 г., изм. ДВ. бр.5 от 14 януари 2011 г.
- Заповед № РД - 01-201/10.07.2018 г. на Министъра на здравеопазването - Методическо указание за антиретровирусно лечение и мониторинг на възрастни лица с HIV-инфекция
- Заповед № РД 01-83/17.03.2016 г. на Министъра на здравеопазването - Методическо указание за профилактика на предаването на ХИВ инфекция от майка на дете.
- Наредба № 21 от 2005 г. за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести, последна редакция и изменение ДВ брой: 5, от дата 15.1.2019 г.

## 16.2. Епщайн-Бар вирус

Епщайн-Бар вирусът (EBV) е причинител на инфекциозна мононуклеоза при имунокомпетентни индивиди, а при имунокомпрометирани пациенти на лимфопролиферативни заболявания. При EBV-свързаната мононуклеоза често се наблюдава повишен брой бели кръвни клетки и атипични лимфоцити. Хетерофилни антитела обикновено се откриват между шестия и десетия ден след началото на симптомите, увеличават се през втората или третата седмица на заболяването и след това постепенно намаляват в рамките на около година или повече. Фалшиво положителни хетерофилни антитела могат да се наблюдават при пациенти с автоимунни заболявания, левкемия, карцином на панкреаса, вирусен хепатит или CMV инфекция. Фалшиво негативни резултати се установяват при около 10% от пациентите и са особено чести при деца на възраст под 4 години.

Когато резултатите от теста за определяне на хетерофилни антитела или Monospot тестът са отрицателни, може да се проведе допълнително лабораторно изследване (Таблица 49) за отдиференциране на инфекция с EBV от мононуклеозо-подобно заболяване, причинено от CMV, HIV или *Toxoplasma gondii*. В тази ситуация се препоръчва изследване на EBV-специфични антитела от клас IgG и IgM към вирусния капсиден (VCA) и ядрен (EBNA) антиген. Наличие на VCA IgM (с или без VCA IgG) антитела в отсъствието на IgG антитела към EBNA предполага скорошна, първична инфекция с EBV. Наличието на анти-EBNA IgG антитела показва, че инфекцията е настъпила най-малко преди 6-12 седмици и следователно е индикатор за минала инфекция с EBV. Антителата от клас IgG срещу EBNA обикновено се развиват 2-3 месеца след първична инфекция и се откриват цял живот. Над 90% от възрастното население има антитела от клас IgG срещу VCA и EBNA, въпреки че приблизително 5%-10% от пациенти, които са били инфектирани с EBV, не успяват да развият антитела към EBNA.

EBV се свързва с лимфопролиферативни заболявания при пациенти с вродена или придобита имунна недостатъчност, включително пациенти с тежка комбинирана имунна недостатъчност, реципиенти на солидни органи или стволови клетки и заразени с HIV пациенти. Увеличение на EBV вирусния товар в кръвта или плазмата, измерено чрез количествен тест за амплификация на нуклеиновата киселина (NAAT), може да се установи при пациенти преди развитието на EBV-асоцирано лимфопролиферативно заболяване. Вирусният товар трябва да се измерва не по-често от веднъж седмично като нивата обикновено намаляват с прилагането на ефективна терапия. Разлика във вирусния товар между пробите от  $> 0.5 \log_{10}$ , за предпочитане оценена чрез същия тест, обикновено демонстрира значителна промяна. Превръщането на EBV копията/mL в IU/mL, използвайки стандарта на Световната здравна организация (СЗО) (или проследим стандарт на СЗО) позволява сравнимост на резултатите получени в различни лаборатории. Тъкани от пациенти с EBV-асоцирани лимфопролиферативни заболявания показват моноклонални, олигоклонални или поликлонални лезии. Диагностициране на EBV-асоцирани лимфопролиферативни заболявания (например, посттрансплантантни лимфопролиферативни прояви) изисква многобройни тестове, включително количествен NAAT, радиология (например позитронно-емисионна томография) и детекция на EBV ДНК, РНК или протеин в биопсични тъкани.

NAAT се прилага и за детекция на EBV ДНК в ликвори на пациенти с ХИВ-асоциран лимфом на ЦНС. Да се има предвид, че EBV ДНК може да бъде открита и в ликвори на пациенти с други аномалии (например, токсоплазмоза на ЦНС, пиогенни абсцеси на мозъка) и следователно позитивният резултат няма голяма диагностична стойност. Откриването на EBV-специфични антитела в ликвора може да е доказателство за инфекция на ЦНС; но може да се наблюдава и при контаминиране на ликвора с кръв по

време на вземането му, или ако има трансфер на антитела през кръвно-мозъчната бариера. Изчисляване съотношението на антителата в ликвора и серума може да бъде полезно, но този тип изследване не се извършва в повечето клинични лаборатории.

**Таблица 49. Лабораторна диагностика на инфекции с Епщайн-Бар вирус**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
Серология (включва тест за определяне на хетерофилни антитела или Monospot тест)	Серум	Съсирена кръв или ВСС, СТ, $\leq 2$ часа
НААТ, качествен	Ликвор	Стерилна епруветка, СТ, $\leq 2$ часа
НААТ, количествен (вирусен товар)	Ликвор Плазма Кръв, лимфоцити от периферна кръв	Стерилна епруветка, СТ, $\leq 2$ часа EDTA или ВП, СТ, $\leq 2$ часа Вакуумтейнер с EDTA или цитрат, СТ, $\leq 2$ часа

Съкращения: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; NAAT, тест за амплификация на нуклеинова киселина; ВП, вакуумтейнер за плазма; СТ, стайна температура; ВСС, вакуумтейнер за сепариране на серум.

### 16.3. Цитомегаловирус

Цитомегаловирусът (CMV) е член на семейство *Herpesviridae* и причинява остра и латентна инфекция. Инфекцията с CMV е често срещана и при повечето имунокомпетентни индивиди води до леко заболяване или протича безсимптомно. В същото време CMV е важен фактор за заболяемостта и смъртността при имунокомпрометирани пациенти, особено при реципиенти на солидни органи или стволови клетки. Серологичното изследване за CMV-специфични антитела обикновено е ограничено до претрансплантационен скрининг на донора и реципиента (Таблица 50). Това обикновено се постига чрез тестване на анти-CMV антитела от клас IgG, които когато присъстват, показват минала инфекция с CMV. Тестването за антитела от клас IgM е с по-малко значение и може да подпомогне диагностициране на скорошна CMV инфекция; да се има предвид, че при пациенти, заразени с EBV или с имунни нарушения, могат да се появят фалшиво положителни резултати за IgM.

При реципиенти на солидни органи или стволови клетки мониторингът на CMV вирусния товар чрез количествен НААТ се използва за диагностициране на асоциирани с CMV симптоми, за определяне на превантивното лечение и за проследяване отговора от антивирусната терапия. За лаборатории, които използват лабораторно разработени тестове (LDT), стандартен референтен материал (SRM) при измерване на CMV вирусния товар може да бъде доставен от Националния институт за стандарти и технологии. SRM 2366, бактериална изкуствена хромозома, съдържаща генома на CMV щама Towne, се използва за определяне броя копия на амплифицируемия геном на CMV/обем (например, копия/ $\mu$ L). Има и 4 одобрени от FDA тест-системи (Abbott RealTime CMV, Abbott Molecular, Inc; Artus CMV RGQ MDx Kit, Qiagen, Inc; Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan CMV тест, Roche Molecular Systems, Inc; Cobas CMV, Roche Molecular Systems, Inc), които са калибрирани съгласно стандарта на СЗО и показват резултатите в международни единици на милилитър. Конвертирането на копия/mL към IU/mL, използвайки стандарта на СЗО, позволява сравнимост на резултатите между отделните лаборатории.

Цитомегаловирусът може да бъде култивиран от периферни кръвни мононуклеарни клетки (и други клинични проби). Изолацията обаче е трудоемка и може да отнеме до

14 дни. Този период може да бъде намален до 1-2 дни при използването на бързи клетъчни култури (shell vials). Освен дългото време друг недостатък при култивирането на CMV е ниската чувствителност. Тъй като вирусният товар обикновено е висок и CMV се отделя в урината на новородените, доказване на CMV в урина с помощта на култивиране продължава да се използва в някои институции за диагностициране на вродена CMV инфекция.

Цитомегаловирусни антигени могат да бъдат установени чрез имунохистохимични или *in situ* хибридизационни тестове на фиксирани с формалин и на включени в парафинови тъкани. Цитомегаловирусна ДНК, доказана с NAAT в различни клинични проби, може да бъде полезна при диагностициране на заболявания свързани с CMV.

При имунокомпрометираните пациенти с CMV инфекция може да възникне резистентност към антивирусните средства. Прилагат се различни изследвания за оценка на антивирусната резистентност, най-често чрез секвениране на гените UL97 (кодира фосфотрансферазата) и UL54 (кодира ДНК полимераза). При секвенционен анализ се използва ДНК, амплифицирана директно от клинични проби, при условие, че те съдържат достатъчно количество CMV ДНК. Алтернативно, вирусът може първо да бъде изолиран в клетъчна култура. Резистентността към ганцикловир най-често се появява поради точкова мутация или делеция в UL97 (с незасегнати фоскарнет и цидофовир), като най-често се наблюдават мутации в 3 кодона (460, 594, 595). Точкови мутации или делеции в UL54 се наблюдават по-рядко. Ако UL54 мутациите са селектирани с ганцикловир или цидофовир, обикновено има кръстосана резистентност както към ганцикловир, така и към цидофовир, но не и към фоскарнет. Ако, обаче, мутациите са селектирани с фоскарнет, обикновено липсва кръстосана резистентност към ганцикловир или цидофовир.

NAAT може да се използва за откриване на CMV ДНК в ликвора при пациенти със съмнение за CMV инфекция в ЦНС, но могат да се появят фалшиво положителни резултати (например при пациенти с бактериален менингит, при които CMV ДНК в кръвта преминава кръвно-мозъчната бариера и контаминира ликвора). Откриването на антитела в ликвора може да показва инфекция на ЦНС; но може да се установят и ако ликворът е контаминиран с кръв по време на вземането му, или ако има трансфер на антитела през кръвно-мозъчната бариера.

**Таблица 50. Лабораторна диагностика на инфекции с цитомегаловирус**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
Серология	Серум	Съсирена кръв или ВСС, СТ, ≤2 часа
	Ликвор	Стерилна епруветка, СТ, ≤2 часа
Антигенемия <sup>a</sup>	Цяла кръв	Вакуумтейнер с хепарин, EDTA или цитрат, СТ, ≤2 часа
Култивиране	Урина	Стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа

**Таблица 50. (продължение)**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
NAAT, качествен	Телесни течности Ликвор Респираторни проби	Стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа

	Тъкани Урина	
NAAT, количествен (вирусен товар)	Плазма  Цяла кръв	EDTA или ВП, СТ, ≤2 часа  Вакуумтейнер с EDTA или цитрат, СТ, ≤2 часа

Съкращения: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; NAAT, тест за амплификация на нуклеинова киселина; BCC, вакуумтейнер за сепариране на серум; ВП, вакуумтейнер за плазма; СТ, стайна температура.

<sup>a</sup> Директно преброяване на оцветени клетки; не е предпочитан метод.

#### 16.4. Варицела зостер вирус

Варицела зостер вирусът (VZV) е представител на семейство *Herpesviridae* и причинител на варицела и херпес зостер (зостер). Серологията обикновено не се препоръчва за диагностициране на остро заболяване, но наличието на анти-VZV антитела от клас IgM обикновено показва скорошна инфекция с VZV. Наличие на антитела от клас IgM може да се наблюдава и при пациенти със скорошна VZV имунизация или при реактивиране на латентен вирус. Положителен резултат за анти-VZV антитела от клас IgG с отрицателен резултат за антитела от клас IgM показва минала инфекция с VZV и/или отговор в резултат на ваксинация. Отрицателен резултат за антитела от клас IgG, съчетан с отрицателен резултат за IgM антитела, показва липса на инфекция с VZV и липса на имунитет, но не изключва VZV инфекция, тъй като серумната проба може да е била събрана преди появата на откриваеми антитела. Отрицателните резултати при съмнение за ранна инфекция с VZV трябва да бъдат последвани от тестване на нова серумна проба след 2-3 седмици.

Култивирането на VZV до поява на цитопатичен ефект може да отнеме до 14 дни. Поради това рутинно за диагностициране на VZV се използва NAAT, който предоставя най-чувствителния и бърз подход за откриване на вируса (Таблица 51). При кожни лезии, за които се подозира, че са свързани с VZV инфекция, клетъчен ексфолиат от кожната лезия взет с тампон се транспортира до лабораторията за изследване. По-малко чувствителен метод е доказване на вирусните антигени в клетъчния ексфолиат с директен имунофлуоресцентен тест. Кожните лезии, потенциално асоциирани с VZV инфекция, трябва да бъдат клинично отдиференцирани от тези при едра шарка. Информация за клиничните прояви на едрата шарка, в т.ч. отдиференцирането от VZV лезиите, както и необходимите лабораторни изследвания могат да бъдат намерени на уебсайта на CDC (<https://www.cdc.gov/smallpox/index.html>).

VZV NAAT може да се използва и при изследване на ликвор с цел диагностициране на VZV инфекция в ЦНС. Откриването на анти-VZV антитела от клас IgM в ликвора може да се използва за потвърждаване на диагноза VZV менингоенцефалит, но трябва да се допълни с оценка за анти-VZV антитела в серума както и с NAAT за ликвора.

**Таблица 51. Лабораторна диагностика на инфекции с варицела зостер вирус**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
NAAT	Клетъчен ексфолиат от кожна лезия, получен с тампон	Транспортна среда, СТ, ≤2 часа
	Ликвор	Стерилна епруветка, СТ, ≤2 часа

**Таблица 51. (продължение)**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
Серология <sup>b</sup>	Серум	Съсирена кръв или ВСС, СТ, ≤2 часа
Директен имунофлуоресцентен тест	Везикуларна течност върху предметно стъкло	Поставете в стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа

Съкращения: NAAT, тест за амплификация на нуклеинова киселина; ВСС, вакуумтейнер за сепариране на серум; СТ, стайна температура.

<sup>b</sup> Изследване за антитела срещу VZV от клас IgM не се препоръчва като средство за установяване на скорошна или остра инфекция; Предпочита се NAAT или култивиране.

### 16.5. Херпес симплекс вирус

Херпес симплекс вируси (HSV) тип 1 (HSV-1) и тип-2 (HSV-2) са чести причинители на кожни и генитални лезии, но могат също да доведат до заболяване на ЦНС или вродени инфекции. Серологията не трябва да се използва като първичен диагностичен тест, но може да помогне за определяне на статуса на пациента по отношение инфекция с HSV-1/2. Наличието на антитела от клас IgG към гликопротеин G на HSV-1/2 показва предишна инфекция със съответния серотип на вируса. Положителните резултати за антитела от клас IgG не дават възможност да бъде отдиференцирана минала от настояща активна инфекция освен ако не бъдат изследвани серуми от острата и конвалесцентна фаза. Четирикратно повишаване нивата на анти-HSV антитела от клас IgG предполага скорошна инфекция; но повечето търговски китове не дават резултати, които да бъдат използвани за количествен анализ. Наличието на антитела от клас IgM към HSV предполага първична инфекция; но реактивност на анти-HSV IgM често липсва по време на развитието на лезията, сероконверсия на IgM се наблюдава 1–2 седмици след инфекцията. Търговските китове за определяне на IgM не са в състояние да разграничат надеждно инфекцията с HSV-1 и HSV-2 и могат да бъдат фалшиво положителни поради други вирусни инфекции, наличие на алоантитела по време на бременност или автоимунни заболявания.

NAAT е най-чувствителният, специфичен и бърз тест за диагностициране на свързани с HSV кожни или лигавични увреждания и може да открива и генотипира HSV-1/2 (Таблица 52). Като клинична проба може да бъде използван клетъчен ексфолиат от кожна или мукозна лезия, получен с тампон, който да се транспортира за изследване във вирусологична лаборатория. От по-стари лезии е по-малко вероятно да се получат положителни резултати. Култивирането и директния имунофлуоресцентен тест са по-малко чувствителни от NAAT особено за откриване на HSV-1/2 в ликвор.

Понастоящем HSV NAAT се счита за златен стандарт при диагностициране на HSV инфекция в ЦНС. Анализът трябва да открива и генотипира HSV-1/2; тип 1 най-често се свързва с енцефалит, а тип 2 с менингит. Култивирането на ликвор е нечувствителен тест за диагностициране на HSV инфекция в ЦНС и не трябва да се използва за изключване на HSV енцефалит/менингит.

**Таблица 52. Лабораторна диагностика на инфекции с херпес симплексвирус**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
NAAT	Клетъчен ексфолиат от кожна или мукозна лезия, получен с тампон Ликвор	Поставете в транспортна среда, СТ, ≤2 часа Стерилна епруветка, СТ, ≤2 часа



**Таблица 52. Лабораторна диагностика на инфекции с херпес симплексвирус**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
Серология <sup>b</sup>	Серум	Съсирена кръв или ВСС, СТ, ≤2 часа
Директен имуофлуоресцентен тест	Везикуларна течност върху предметно стъкло	Поставете в стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа
Култивиране	Клетъчен ексфолиат от кожна или мукозна лезия, получен с тампон	Поставете в транспортна среда, СТ или в сух лед, ≤2 часа

Съкращения: *NAAT*, тест за амплификация на нуклеинова киселина; *ВСС*, вакуумтейнер за сепариране на серум; *СТ*, стайна температура.

<sup>b</sup> Изследване за антитела срещу *HSV* от клас *IgM* не се препоръчва като средство за установяване на скорошна или остра инфекция; Предпочита се *NAAT* или култивиране.

### 16.6. Човешки херпесен вирус тип 6

Човешкият херпесен вирус тип 6 (HHV-6) причинява розеола инфантум при деца и първична инфекция или реактивация при имунокомпрометирани пациенти. Въпреки че серологичното изследване не е предпочитан метод за диагностициране на HHV-6 инфекция, сероконверсия на антитела от клас IgG, установяване анти-HHV-6 антитела от клас IgM или 4-кратно повишаване на титрите на IgG антителата при изследване на двойка серуми може да показва скорошна инфекция. Търговските китове обикновено не разграничават варианти А и В на HHV-6. Поради повсеместното разпространение на HHV-6, повечето хора са се срещали с вируса до 2-годишна възраст. Ето защо, положителен резултат за анти-HHV-6 антитела от клас IgG не е в състояние да отдиференцира скорошна от минала инфекция. Най-често използваният молекулярен тест за лабораторна диагностика на HHV-6 е NAAT; има и тестове, които отдиференцират варианти А и В на HHV-6 (Таблица 53). Но качественият NAAT не отдиференцира реплициращия се от латентния вирус. Количественото определяне на HHV-6 ДНК може да бъде полезно в това отношение, както и в мониторинга на отговора от антивирусното лечение. HHV-6 може да се отделя периодично както от здрави така и от имунокомпрометирани индивиди. Следователно откриването на HHV-6 в кръвта, телесните течности или дори в тъканите не е доказателство за етиологичната роля на HHV-6 за дадено заболяване. Хромозомно интегрираният HHV-6, който води до високи нива на HHV-6 в почти всички клинични проби, може да доведе до погрешни изводи за активна инфекция. HHV-6 може да бъде култивиран от периферни кръвни мононуклеарни клетки (и други клинични проби). Въпреки това, вирусната изолация е трудоемка и отнема до 21 дни. Този период може да бъде съкратен до 1–3 дни с използването на бързи клетъчни култури (*shell vials*). Но култивирането не е достатъчно чувствителен метод и не дава възможност за отдиференциране на варианти А и В. При тъканни биопсични материали фиксирани с формалин и включени в парафин HHV-6 антигени могат да бъдат доказани чрез имунохистохимични или *in situ* хибридационни тестове.

**Таблица 53. Лабораторна диагностика на инфекции с човешки херпесен вирус тип 6**

Диагностични процедури	Подходящи проби	Транспортиране, оптимално време за транспортиране
Серология	Серум	Съсирена кръв или ВСС, СТ, ≤2 часа
NAAT	Ликвор Плазма Слюнка Серум Цяла кръв, РВМС	Стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа EDTA или ВП, СТ, ≤2 часа Стерилен контейнер, СТ, ≤2 часа ВСС, СТ, ≤2 часа Вакуумтейнер с EDTA или цитрат, СТ, ≤2 часа

Съкращения: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; NAAT, тест за амплификация на нуклеинова киселина; РВМС, мононуклеарни клетки от периферна кръв; ВП, вакуумтейнер за плазма; ВСС, вакуумтейнер за сепариране на серум; СТ, стайна температура.

### 16.7. Морбилен вирус

Морбили е високо контагиозно остро инфекциозно заболяване, характеризиращо се с висока температура, генерализиран макулопапулозен обрив  $\geq 3$  дни, както и поне един от следните три признака (т. нар. морбилна триада): кашлица, хрема и конюнктивит. Причинител на заболяването е морбилният вирус, който в естествена среда инфектира само хора и човекоподобни маймуни (Perry et al., 2004, Sato et al., 2012), като специфични вирусни рецептори са мукопротеиновите клетъчни рецептори - CD46 и CDw150.

Рутинната диагностика на остра инфекция с морбилен вирус се основава на серологично изследване и доказване на специфични морбилни антитела от клас IgM. Морбилните IgM антитела често се позитивират към момента на поява на обрива, но до 20% от пациентите, могат да бъдат серологично отрицателни в рамките на 72 часа след появата на обрив. Поради тази причина, при съмнения за случаи на морбили, се препоръчва от първоначално серонегативни пациенти по време на острата фаза, да бъдат събрани втори серумни проби в рамките на 72 часа след появата на обрив и повторно изследвани за наличие на анти-морбилни IgM антитела, с цел доказване на сероконверсия. Морбилните IgM антитела могат да бъдат открити в серумни проби от пациентите до един месец или повече след началото на заболяването. Вирусен маркер IgM може да бъде положителен и при наскоро ваксинирани здрави лица.

Наличие на защитен имунитет срещу морбили в следствие на преболедуване и/или ваксинация се определя от морбилни антитела клас IgG. Серологичната диагностика на морбили може да се извърши и на база отчитане на сероконверсия на анти-морбилни IgG антитела или 4-кратно повишаване на титъра на IgG антителата между острата фаза на инфекцията (серумни проби събрани по време на появата на обрив) и фазата на възстановяване (събрани 10–30 дни по-късно) (Таблица 54).

Вирусът на морбили може да бъде изолиран чрез клетъчно култивиране или посредством тест за амплификация на нуклеинова киселина (nucleic acid amplification test, NAAT) в гърлени, назофарингеални натривки, носни аспирати или урина, събрани в първите дни след появата на обрив (van Binnendijk и сътр., 2003). Такова изследване за страната се извършва единствено в Националната референтна лаборатория „Морбили, паротит, рубеола” към Националния център по заразни и паразитни болести.

Рядко инфекцията с морбили може да доведе до развитие на субакутен склерозиращ паненцефалит (ССПЕ, SSPE) - рядка, хронична, прогресивна дегенерираща форма на мозъчно възпаление с различна инфекциозна нокса, което се развива в продължение на години след прекарана първична, неусложнена инфекция.

При съмнения за случаи на SSPE се препоръчва изследване за наличие на IgG антитела срещу морбили в ликвор (CSF). Важно е интратекалният синтез на тези антитела да се потвърди чрез отхвърляне на възможността за въвеждане на анти-морбилни антитела в ликвора чрез замърсяване през кръвта (напр. по време на травматична лумбална пункция) или при дефектна пропускливост на кръвно-мозъчната бариера.

**Таблица 54. Лабораторна диагностика на морбилна инфекция**

Диагностична процедура	Подходящ клиничен материал	Начин на събиране, температура на съхранение, оптимално време за транспортиране
Серологичен тест	серум	стерилни контейнери, SST, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период до 7 дни в хладилна верига 4-8°C
	ликвор	стерилни контейнери, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период в хладилна верига 4-8°C
Доказване на вирусна нуклеинова киселина (NAAT - RT-PCR, real time RT-PCR)	носогърлен секрет, орална течност	стерилни контейнери, с вирусна транспортна среда, < 2 часа, на стайна температура
	урина	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
	цяла кръв	EDTA или цитратни епруветки, < 2 часа, на стайна температура
	ликвор	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
Вирусно култивиране	носогърлен секрет, назални аспирати	стерилни контейнери, с вирусна транспортна среда, < 2 часа, на стайна температура или на сух лед
	урина	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
	цяла кръв	EDTA или цитратни епруветки, < 2 часа, на стайна температура
	ликвор	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура

### 16.8. Рубеолен вирус

Рубеолата е леко протичащо остро инфекциозно заболяване, характеризиращо се с генерализиран макулопапулозен обрив, субфебрилна температура и лимфонулопатия. Серологичното изследване за наличие на анти-рубеолни антитела (IgM и IgG) може да бъде използвано за установяване на имунитет срещу рубеола и за лабораторно доказване на рубеолна инфекция (Таблица 55). Присъствието на анти-рубеолни IgG антитела при здрави, асимптомни лица е свидетелство за наличие на защитен имунитет срещу рубеола.

Различават се две форми на болестта: придобита (постнатална) и вродена.

Острата рubeолна инфекция може да бъде серологично потвърдена чрез доказване на сероконверсия на IgM и/или IgG антитела или 4-кратно повишаване на титъра на анти-рубелни IgG антитела при проби взети по време на острата и възстановителната фаза на инфекцията.

Само около 50% от пациентите имат положителен резултат за рubeолни IgM антитела по време на появата на обрив. Това подчертава значението на събирането на втори серумни проби с цел избягване на фалшиво негативен резултат, по време на възстановителния етап - 14–21 дни (минимум 7 дни) по-късно от първата.

Синдромът на вродена рubeола (ВРС) може да бъде диагностициран чрез доказване наличието на рubeолни антитела от клас IgM при новороденото, успоредно със типичните симптоми, съответстващи ВРС (вродена катакрата/глаукома, ретинопатия, вродена сърдечна аномалия, глухота от сензороневрален тип). Лабораторните резултати трябва да се интерпретират заедно с данни за експозиция на майката и липсата на предходен защитен имунитет при нея. NAAT за откриване на вирусна РНК може да се извърши чрез използване на клиничен материал – носогърлен секрет и урина. Такова изследване, за страната, се извършва единствено в НРЛ „Морбили, паротит, рubeола” към НЦЗПБ. Пробите за NAAT трябва да се събират в рамките на 7 дни след докладване на съмнителен за рubeола или ВРС случай.

**Таблица 55. Лабораторна диагностика на рubeолна инфекция**

Диагностична процедура	Подходящ клиничен материал	Начин на събиране, температура на съхранение, оптимално време за транспортиране
Серологичен тест	серум	стерилни контейнери, време на транспортиране ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период до 7 дни в хладилна верига 4-8°C
Доказване на вирусна нуклеинова киселина (NAAT - RT-PCR, real time RT-PCR)	носогърлен секрет, орална течност	стерилни контейнери, с вирусна транспортна среда, < 2 часа, на стайна температура
	урина	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура

### 16.9. Паротитен вирус

Паротитният вирус предизвиква епидемичен паротит - остра инфекциозна въздушно-капкова инфекция, съпътствана с оток на слюнчените жлези, предимно околоушните, подчелюстните и подезични и характерен дифузен оток по шията. Паротитният вирус има подчертан тропизъм към жлезистата тъкан и в по-малка степен към нервната.

Наличието на защитен имунитет срещу паротит се доказва с откриването на анти-паротитни антитела от клас IgG в серумни проби. Лабораторното диагностициране на инфекция с паротитен вирус се основава на положителен серологичен тест за анти-паротитни IgM антитела и/или сероконверсия или 4-кратно нарастване на титъра на IgG антитела в серумни проби взети по време на острата и възстановителна фаза (Таблица 56). В идеалния случай, първата серумна проба от остра фаза трябва да бъде взета незабавно при съмнение за инфекция с паротитен вирус и/или при поява на клинични симптоми, а този от възстановителната, приблизително 5-10 дни след първата. IgM антителата срещу паротит обикновено стават откриваеми от първите няколко дни на заболяването, с пик около 1 седмица след началото и се доказват около месец след това.

При имунизирани пациенти, които в последствие са инфектирани с паротитен вирус, не се развива откриваем IgM отговор срещу вируса. При такива лица лабораторното потвърждение на инфекцията изисква изолиране на самия вирус или откриване на вирусна РНК. Такива изследвания за страната се извършват единствено в НРЛ „Морбили, паротит, рубеола” към НЦЗПБ. Предпочитаните клинични проби за клетъчно култивиране и NAAT са орална течност или тампон с обтривка от устната кухина (бокална обтривка) и засегнатата паротидна жлеза (Krause et al., 2006). РНК на паротитния вирус може да бъде доказана няколко дни преди развитие на паротит и до 5-9 дни след началото на симптомите. За разлика от морбили, пробите урина не се считат за чувствителни при клетъчно култивиране или NAAT, тъй като вирус не се открива в този клиничен материал до 4 дни след поява на клиничните симптоми.

**Таблица 56. Лабораторна диагностика на паротитна инфекция**

Диагностична процедура	Подходящ клиничен материал	Начин на събиране, температура на съхранение, оптимално време за транспортиране
Серологичен тест	серум	стерилни контейнери, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период до 7 дни в хладилна верига 4-8°C
	ликвор	стерилни контейнери, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период в хладилна верига 4-8°C
Доказване на вирусна нуклеинова киселина (NAAT - RT-PCR, real time RT-PCR)	носогърлен секрет, орална течност	стерилни контейнери, с вирусна транспортна среда, < 2 часа, на стайна температура
	урина	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
	ликвор	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
Вирусно култивиране	носогърлен секрет, назални аспирати	стерилни контейнери, с вирусна транспортна среда, < 2 часа, на стайна температура или на сух лед
	урина	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура
	ликвор	стерилни контейнери, < 2 часа, на стайна температура

### 16.10. Парвовирус (Erythrovirus) B19

Парвовирус B19 се свързва с различни клинични синдроми, включително erythema infectiosum (синдром „стъпала-длани” (gloves-and-socks) и „плесница” („slapped-cheek”), артралгия/артрит при имунокомпетентни индивиди, преходна апластична криза при имунокомпроментирани пациенти, вродена инфекция и фетална смърт (hydrops fetalis), настъпваща при неимунни жени, които се заразяват с вируса по време на бременността. Вирусната репликация протича в клетките на човешкия костен мъзък с главен клетъчен рецептор - кръвно-груповия Р антиген, разположен на повърхността на широк набор от клетки, което определя неговия тропизъм - еритроидните прогениторни клетки на костния мозък. Болестта често е двуфазна като началото се свързва с неспецифично фебрилно заболяване, последвано от поява на обрив и/или артралгия приблизително 1 седмица по-късно. Важно е, че класическият обрив е имунологично медиран, тъй като неговият външен вид съответства на развитието на IgM антители отговор срещу

вируса в организма. Серологичното изследване включва доказване наличието на IgM и/или IgG антитела срещу парвовирус В19. Той именно е препоръчан метод за диагностично изследване и оценка на възможна парвовирус В19 инфекция (Таблица 57). Антитела от клас IgM срещу вируса се откриват в рамките на 10-12 дни след инфекцията, а IgG антителата се установяват до 2 седмици след това (Ramirez et al., 2005; Anderson et al., 1985; Heegaard et al., 2002). Приблизително 90% от пациентите с erythema infectiosum са с положителен резултат за наличие на IgM антитела по време на острата фаза на заболяването. Антителата срещу парвовирус В19 достигат пикови титри в рамките на 1 месец. Персистирането на антитела от клас IgM може да продължи месеци, наличието на IgG антитела е показател за минало инфектиране и могат да циркулират пожизнено в организма и осигуряват траен имунитет към реинфекция.

Серологично изследване за парвовирус В19 остава препоръчителната методология за оценка на бременни жени с възможна експозиция или инфекция. Положителни резултати за парвовирус В19 IgM и IgG антитела са индикатор за инфекция в рамките на последните 3 месеца и възможен риск от инфекция на плода. Изследванията показват, че серологичните тестове могат да бъдат отрицателни при имунокомпрометиран гостоприемник, въпреки предшестващото излагане на вируса. Парвовирус В19 NAAT има по-добра чувствителност в сравнение със серологичните методи при пациенти с апластична криза или хронична анемия. Поради тази причина NAAT е предпочитана неинвазивна техника за лабораторна диагностика при парвовирус В19 асоциирана анемия при имunosупресирани индивиди, както и при реципиенти на трансплантирани органи. Важна забележка при използването на NAAT за диагностика на парвовирус В19 свързана анемията е, че ДНК на вируса може да бъде доказана в серума и на здрави индивиди (Soderlung-Venemo et al., 2002).

**Таблица 57. Лабораторна диагностика на парвовирус В19 инфекция**

Диагностична процедура	Подходящ клиничен материал	Начин на събиране, температура на съхранение, оптимално време за транспортиране
Серологичен тест	серум	стерилни контейнери, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период до 7 дни в хладилна верига 4-8°C
Доказване на вирусна нуклеинова киселина (NAAT - PCR, real time PCR)	серум	стерилни контейнери, ≤ 2 часа, на стайна температура, за по-дълъг период до 7 дни в хладилна верига 4-8°C
	плазма	EDTA или PPT (плазма отделящи епруветки), ≤ 2 часа, на стайна температура
	цяла кръв	EDTA или цитратни епруветки, ≤ 2 часа, на стайна температура

### Литература

1. Perry R, Halsey T, Neal A. The Journal of Infectious Diseases, 189, 2004, 1: 4-16.
2. Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus Receptors and Tropism: Multiple Pathways for Infection. Front Microbiol. 14, 2012, 3: 3-75.
3. van Binnendijk RS, van den Hof S, van den Kerkhof H, et al. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus

infections during an outbreak of measles in the Netherlands. J Infect Dis, 2003; 188:898-903.

4. Krause CH, Eastick K, Ogilvie MM. Real-time PCR for mumps diagnosis on clinical specimens - comparison with results of conventional methods of virus detection and nested PCR. J Clin Virol 2006; 37:184-9.
5. Ramirez MM, Mastrobattista JM. Diagnosis and management of human parvovirus B19 infection. Clin Perinatol 2005; 32:697-704.
6. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, et al. Experimental parvoviral infection in humans. J Infect Dis 1985; 152:257-65.
7. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. Clin Microbiol Rev 2002; 15:485-505.
8. Soderlung-Venemo M, Hokynar K, Nieminen J, Rautakorpi H, Hedman K. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. Pathol Biol (Paris) 2002; 50:307-16.

### **16.11. Лабораторна диагностика на вирусните хепатити**

Повишаването на нивото на серумните аминотрансферази - аланин аминотрансфераза (ALAT) и аспартат аминотрансфераза (ASAT) са най-ранният индикатор за възпалителен процес в черния дроб в резултат на увреждане на хепатоцитите. Увеличаването на тези клетъчни ензими започва още в продромалната фаза и предшества нарастването на серумния билирубин. Съществуват разнообразни диагностични методи за откриване на хепатотропните вируси, но най-масово се прилага имуноензимният метод за откриване както на директни така и на индиректни вирусни маркери в кръвта. Молекулярно-биологичните методи за диагностика, преди всичко за амплификация на вирусния геном, също намират все по-широко приложение.

#### **16.11.1. Вируси на хепатит А и Е**

За лабораторно потвърждаване на диагнозата *hepatum A* трябва да има поне един от следните три критерия:

- откриване на нуклеинова киселина на вируса на хепатит А в серум или изпражнения;
- специфичен анти тяло-отговор срещу вируса на хепатит А;
- откриване на антиген на вируса на хепатит А в изпражненията.\*

Основният специфичен серологичен маркер на хепатит А вирусна инфекция, независимо от това дали е клинично проявена или не, са антителата срещу вируса от класа IgM (anti-HAV-IgM). Те се явяват заедно с появата на клиничната симптоматика в края на инкубационния период (средно 30 дни), достигайки бързо пикова стойност, за период от около 2-3 месеца. В преобладаващия брой случаи изчезват след шестия месец. При част от пациентите с остър вирусен хепатит anti-HAV-IgM антителата се явяват с известно закъснение, което може да усложни поставянето на диагнозата, така че се налага повторно изследване. Другият специфичен индиректен маркер на хепатит А инфекцията - антитела от клас IgG (anti-HAV IgG), се откриват малко по-късно, като се задържат за много дълъг период от време. Наличието на HAV IgG антитела показва или минала инфекция с хепатит А или имунитет към тази вирусна инфекция след ваксинация. Директният маркер за хепатит А инфекцията е установяване на хепатит А антиген (HAVAg) във фекалии. Той се явява една до две седмици преди клиничната симптоматика, с излъчване до две седмици след остроото начало. Има ограничено диагностично значение и се използва рядко, най-често при епидемични показания. Значение за ранната диагноза има откриването на HAV РНК чрез амплификационни

методи в кръвни проби от инфектирани пациенти, като пробите се позитивират още в средата на инкубационния период, когато вирусната репликация достига пикови стойности. В диагностичната практика най-използваните серологични маркери на HAV (anti-HAV IgM/IgG) се откриват с имуноензимен метод (ELISA).

За лабораторно потвърждаване на диагнозата *хепатит Е* трябва да има поне един от следните два критерия:

- откриване на anti HEV IgM антитела в комбинация с покачващи се стойности на anti HEV IgG антитела в серума срещу вируса на хепатит Е,
- откриване на нуклеиновата киселина на вируса на хепатит Е в серум или изпражнения.\*

Хепатит Е обикновено е заболяване, предавано чрез храна, в развиващите се страни поради поглъщането на вируса на хепатит Е (HEV), предаван чрез замърсени храни и вода. Въпреки това, такава инфекция в развитите страни може да бъде срещната при пътуващите в ендемични райони (остър хепатит Е) или реципиенти на трансплантиран орган (остра или хронична). Тъй като острият хепатит А и Е са клинично неразличими, диагнозата на последния обикновено се потвърждава чрез наличие на HEV IgM антитела (появяващи се след 4–6 седмици след експозиция и с продължителност 2-4 месеца) и отсъствие на HAV IgM антитела в серум или плазма. HEV IgG антителата в серума и плазмата обикновено се появяват 4 седмици след клиничното лечение. В случаи на забавен хуморален отговор при реципиенти, които са имunosупресирани с терапия и съмнение за остър хепатит Е, диагноза може да се постави с молекулярни методи за откриване на HEV РНК в серум или плазма. При индивиди с персистиране на HEV РНК  $\geq 3$  месеца се счита, че има хроничен хепатит Е и количественото определяне може да се използва за наблюдение на HEV РНК в серума или плазмата за прогресията на заболяването и като отговор на антивирусната терапия.

### 16.11.2. Вируси на хепатит В, D и С

За лабораторно потвърждаване на *хепатит В* трябва да има положителни резултати от поне един (или повече) от следните тестове или комбинации от тестове:

- IgM антитяло за ядрения антиген на хепатит В (anti-HBc IgM),
- повърхностен антиген на хепатит В (HBsAg),
- е-антиген на хепатит В (HBeAg),
- нуклеинова киселина (ДНК) на хепатит В (HBV DNA).\*

Основен диагностичен маркер на острата HBV инфекция е повърхностният антиген на вируса (HBsAg), който се явява в кръвта още по време инкубационния период и заедно с вирусната ДНК, откривана в серума, са първите директни маркери. Следващият маркер е „е” антигена на HBV (HBeAg), който без да участва във формирането на вириона се открива при активно вирусно размножаване. При задържането на HBeAg наред с HBsAg и HBV ДНК за повече от 2-3 месеца може да се прогнозира хронифициране на HBV инфекцията. При пациенти с хроничен хепатит В присъствието на е-антигена на хепатит В (HBeAg) в серума или плазмата е маркер за високи нива на вирусна репликация в черния дроб. Загуба на HBeAg и поява на антитяло към HBeAg (т.е., HBe антитяло) обикновено се свързва с подобряване на хепатита и намаляване на риска от хепатоцелуларен карцином и цироза. Останалите маркери на HBV са индиректни и представляват имунния отговор на организма срещу отделните белтъчни компоненти на HBV. Характерен маркер на острата HBV инфекция са антителата срещу ядрения антиген на вируса от класа IgM (anti-HBc-IgM). Появата им съпровожда първите клинични симптоми, като до 6 месеца от началото на инфекцията, те намаляват



до неоткриваемо равнище. Малко след тях в острата фаза на заболяването могат да бъдат открити и антитела срещу същия антиген от класа IgG (anti-HBc-IgG), като след шест месеца, те напълно заместват ранните антитела. При благоприятно приключила HBV инфекция, още по време на острата фаза, синтезът на HBsAg рязко намалява и след период от 3 до 6 месеца се появяват неутрализиращи антитела (anti-HBsAg) срещу него. Те представляват хуморалния имунитет и се откриват както след преболедуването, така и след успешна ваксинация срещу HBV. Мониторингът на серумната HBV ДНК с молекулярно биологични методи (PCR) е от съществено значение за оценка на активността на заболяването, диференциране на други хепатотропни вируси при неактивните носители на HBV, прогнозиране на риска от развитие на хепатоцелуларен карцином. Количественото определяне на HBV ДНК е свързано с вземане на решение за започване на антивирусна терапия, определяне на отговора на антивирусно лечение, предсказване на риска от развитие на лекарствена резистентност, както и откриване появата на резистентни мутанти.

Лабораторните критерии за потвърждаване на диагнозата хепатит D са:

- IgM/IgG антитела срещу хепатит D вируса (anti-HDV) и наличие на повърхностния антиген на хепатит B вируса (HBsAg - положителни);
- доказване на хепатит D антиген (HDAg) в клинични проби;
- доказване на нуклеинова киселина в клинични проби.\*

Рутинната диагностика на хепатит тип D се основава главно на откриването на индиректни маркери на тази инфекция - антитела срещу HDV от класовете IgM и IgG. Директните методи за откриване на HDAg или HDV РНК в хепатоцитите или кръвното русло също намират място в диагностичния процес. При остра хепатит D суперинфекция на пациент с известен хроничен хепатит B се откриват както антигенът на вируса на хепатит D (HDV), HDV IgM, така и общите антитела (HDV Ab). При остра хепатит B и D коинфекция, се откриват същите серологични маркери (т.е. HDV антиген, HDV IgM и общи антитела-HDV Ab), но се откриват и HBc IgM антитела. С въвеждането в практиката на нови модификации на амплификационните методи (Real-Time RT-PCR) се подобрява детекцията на HDV РНК, както и възможността за количествено определяне и разграничаване генотиповете на вируса.

За лабораторно потвърждаване на диагнозата *хепатит C* трябва да има поне един от следните три критерия:

- откриване на нуклеинова киселина на вируса на хепатит C (РНК на HCV),
  - откриване на ядрен антиген на вируса на хепатит C (HCV ядро),
  - специфичен анти тяло отговор срещу вируса на хепатит C (anti-HCV),
- потвърден с тест за потвърждаване на антитела (напр. имуноблот) при лица на възраст над 18 месеца без данни за преминала инфекция.\*

Обикновено диагнозата инфекция с вируса на хепатит C (HCV) се поставя със скринингов тест за HCV IgG антитела в серум или плазма. Антителата не могат да бъдат откриваеми до 6-10 седмици след началото на инфекцията. Тези с положителни резултати от теста за скрининг на HCV IgG антитела трябва да бъдат потвърдени с потвърдителен тест или допълнително тествани за HCV РНК чрез молекулярни методи за изпитване. РНК на вируса на хепатит C може да бъде открита чрез амплификационни методи скоро след инфектиране, както и при хронична инфекция. Тестът за HCV РНК може да се извърши качествено или количествено (чрез RT-PCR или методи за амплифициране чрез транскрипция). Това са силно чувствителни молекулярни анализи за количествено определяне на HCV РНК в серум или плазма (граница на откриване  $\leq 25$  IU / mL), за да се определи лечението и да се проследи вирусологичния отговор на пациентите (т.е. устойчив вирусологичен отговор) от антивирусна терапия. Определяне

на HCV генотипа и подтиповете се използва за насочване на избора и продължителността на антивирусната терапия и прогнозиране на вероятността за отговор на терапията. Различните генотипове и подтипове варират по вирусологичен отговор към настоящите схеми на лечение и може да се открие резистентност преди или по време на антивирусната терапия с директно действащи антивирусни средства (DAA).

\*Наредба № 21 на МЗ за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести. Издадена от министъра на здравеопазването  
Обн. ДВ. бр.62 от 29 Юли 2005г., изм. ДВ. бр.52 от 8 Юли 2011г., изм. и доп. ДВ. бр.56 от 8 Юли 2014г., изм. и доп. ДВ. бр.5 от 15 Януари 2019 г.

**Таблица 58. Серологичен профил на специфичните маркери на хепатотропните вируси при остър и хроничен хепатит**

Вирусен маркер	Интерпретация
HAV anti-HAV IgM (+) пол.	Остър хепатит А
anti-HAV IgG (+) пол.	Минала хепатит А инфекция
HEV anti-HEV IgM (+) пол.	Остър хепатит Е
HEV anti-HEV IgM (-) отр.	Минала хепатит Е инфекция
HBV HBsAg (+) пол; anti-HBc IgM (+) пол.	Остър хепатит В
HBsAg (-) отр.; anti-HBc IgM (+) пол. anti-HBe (+) пол.; HDV РНК (-) отр.	Фаза на оздравяване след остър хепатит В (1- 3 месеца от началото)
HBsAg (-) отр.; anti-HBc (+) пол. anti-HBe (+) пол.; HDV РНК (-) отр. anti-HBs (+) пол.	Оздравяване след остър хепатит В
HBsAg (+) пол; anti-HBc (+) пол. anti-HBe (+) пол.; HBV ДНК (< 10 000 IU/ml)	Хроничен хепатит В (неактивна форма)
HBsAg (+) пол; anti-HBc IgM (-) отр. HBeAg / anti-HBe (+) пол.; HAV РНК (+) пол.	Хроничен хепатит В
HDV HBsAg (+) пол; anti-HDV IgM/IgG (+) пол. anti-HBc IgM (+) пол. HDV РНК (+) пол.	Коинфекция HDV/HBV
HBsAg (+) пол; anti-HDV IgM/IgG (+) пол. anti-HBc IgM (-) отр. HDV РНК (+) пол.	Суперинфекция HDV/HBV
HBsAg (-) отр. ; anti-HDV IgG (+) пол. anti-HBs (+) пол..	Минала HDV инфекция с оздравяване
anti-HCV (-) отр. HCV РНК (+) пол.	Остра хепатит С инфекция
anti-HCV (+) пол. HCV РНК (+) пол. (> 6м.)	Хронична хепатит С инфекция
anti-HCV (+) пол. HCV РНК (-) отр.	Минала хепатит С инфекция с оздравяване
Съкращения: HBsAg повърхностен антиген на HBV; anti-HAV IgM/IgG антитела срещу HAV; HAV РНК- хепатит А вирусна РНК; anti-HEV IgM/IgG антитела срещу HEV; HEV РНК- хепатит Е вирусна РНК; anti-HBc IgM/ IgG – антитела срещу ядрения антиген на HBV; HBeAg / anti-HBe – хепатит Е антиген/антитела; HBV ДНК - ДНК на HBV; anti-HDV IgM/IgG Антитела IgM/IgG срещу HDV; anti-HCV-IgG антитела срещу HCV; HCV РНК – хепатит С вирусна РНК.	

## **16.12. Инструкция за събиране, съхранение и транспортиране на клинични материали за лабораторна диагностика на хепатитни вируси А, В, С, D и E**

### **16.12.1. Клинични материали за серологична диагностика на хепатитен А вирус, хепатитен В вирус, хепатитен С вирус, хепатитен D вирус и хепатитен E вирус.**

*Вид на пробата за изследване: серум / плазма*

*Обем на пробата за изследване: минимум 0.5 мл. серум/плазма или 5 мл. венозна кръв, когато се изпраща такава.*

*Инструкции за вземане, съхранение и транспорт на серумни проби:*

- Взема се до 5 ml **венозна кръв** чрез венепункция в стерилни вакутейнери (епруветката от затворена система за вземане на венозна кръв) **с червена или жълта капачка.**

- Преди отделянето на серума цялата кръв може да бъде съхранявана на **4-8°C** до 6 часа. Цялата кръв **НЕ СЕ ЗАМРАЗЯВА!**

- Цялата кръв се центрофугира на 3000 об. за 10 мин.;

- Серумът (надутайката) се отделя внимателно в стерилни етикетирани епруветки (**пълни се не повече от 2/3 от обема на епруветката**), като се избягва прехвърлянето на червени кръвни клетки заедно с него.

- Ако не е налична центрофуга, кръвта се съхранява в хладилник на **4°C** за не повече от 6 часа, докато не се отдели напълно серума, след което се спазва процедурата по отделяне.

- При транспортирането трябва да се осигури тройна опаковка на съдържанието: първичната епруветка, в която е самата проба, защитена от омекотяващ материал, следва картонена или пластмасова кутия, защитаващи пробата от външен натиск и накрая – найлонов плик със съответните етикети и обозначения.

- Съхранение и транспортиране на серумната проба в хладилна верига при **4-8°C** до доставка в лабораторията.

**Серумната проба е стабилна до 5 дни при температура на съхранение от 2°C до 4°C или 3 месеца при температура - по-ниска от -10°C.**

### **16.12.2. Клинични материали за молекулярна диагностика посредством тестове за амплификация на нуклеинови киселини (NAAT) на Хепатитен А вирус, хепатитен В вирус, хепатитен С вирус, хепатитен D вирус и хепатитен E вирус.**

**Посредством NAAT се изследват проби серологично положителни за съответната хепатитна инфекция.**

*Вид на пробата за изследване: серум / плазма*

*Обем на пробата за изследване: минимум 1 мл. серум/плазма или 5 мл. венозна кръв, когато се изпраща такава.*

*Инструкции за събиране, съхранение и транспорт на серумни проби:*

- Взема се до 5 ml **венозна кръв** чрез венепункция в стерилни вакутейнери (епруветката от затворената система за вземане на венозна кръв) **с лилава капачка**, съдържаща антикоагулант EDTA. Цялата кръв **НЕ СЕ ЗАМРАЗЯВА!**

- Цялата кръв се центрофугира на 3000 об. за 10 мин.

- Плазмата (надутайката) се отделя внимателно в стерилни етикетирани епруветки (**пълни се не повече от 2/3 от обема на епруветката**), като се избягва прехвърлянето на червени кръвни клетки заедно с него. Замразява се веднага при **-20°C**.

- Ако не е налична центрофуга, кръвта се съхранява в хладилник на **4°C** за не повече от 6 часа, докато не се отдели напълно плазмата, след което се спазва процедурата по отделяне.

- При транспортирането трябва да се осигури тройна опаковка на съдържанието: първичната епруветка, в която е самата проба, защитена от омекотяващ материал, следва картонена или пластмасова кутия, защитаващи пробата от външен натиск и накрая – найлонов плик със съответните етикети и обозначения.

- Съхранение и транспортиране на пробата в хладилна верига **замразена** до доставка в лабораторията.

**Пробата е стабилна до 3 дни при съхранение на стайна температура, 7 дни – при съхранение в хладилник и 45 дни - при -40°C.**

### **16.13. Ентеровируси и пареховируси**

Ентеровирусите са многобройна група вирусни патогени, които причиняват инфекции, протичащи в повечето случаи безсимптомно, но които могат да предизвикат и различни клинични състояния, вариращи по тежест от леки респираторни инфекции до тежки инфекции на централната нервна система със или без поява на парализи, инфекции на сърдечно-съдовата система (перикардити и миокардити), сепсис на новороденото, синдрома ръка-крак-уста, херпангина, конюнктивит, епидемична плевродиния, фебрилни състояния, придружени или не от екзантеми и/или енантеми. Макар и рядко, инфекциите могат да прогресират до летален изход. В контекста на полиомиелитната ерадикация е възможно да се очаква засилена циркулация на неполиомиелитните ентеровируси в глобален мащаб (*Rieder* и съавт., 2001). Зачестяват съобщенията за тежко протичащи ентеровирусни инфекции (*Dyrdak* и съавт., 2016, *Solomon* и съавт., 2010; *Casaas-Alba* и съавт., 2017), което налага включването им в диференциално диагностичен аспект при неврологични и респираторни инфекции.

Ентеровирусите циркулират целогодишно, но с ясно изразен пик през лятото и ранната есен. Безсимптомното излъчване на ентеровируси през респираторни секрети и фецес е много често срещано. Често се наблюдава едновременна циркулация на няколко ентеровирусни типа.

Пареховирусите имат подобна на ентеровирусите клинична презентация. Обикновено те причиняват леки респираторни или стомашно-чревни неразположения, но особено у малки деца могат да предизвикат и тежки заболявания (*Olije*, 2018).

Диагностиката на ентеро- и пареховирусните инфекции е комплексна задача, имайки предвид познатите до момента 116 ентеровирусни типа и повече от 19 генотипа пареховируси.

Най-чувствителният диагностичен метод при суспектна ентеро- и пареховирусна инфекция е полимеразната верижна реакция с обратна транскрипция (RT-PCR). Изолирането в клетъчни култури е значително по-бавен и по-слабо чувствителен метод. Чувствителността на *RT-PCR* при изследване на ликвор за ентеровирусна невроинфекция е >95%, докато чувствителността на клетъчно-културелния метод е 65-75% (*Debiasi*, 2004). За молекулярна детекция на пареховируси се прилага различен от ентеровирусния протокол за RT-PCR, тъй като ентеро- и пареховирусите принадлежат към различни родове в сем. *Picornaviridae*.

При суспектна ентеро- или пареховирусна инфекция най-подходящите клинични материали са фекалната и ликворната проба, както и фарингеален секрет, взети възможно най-скоро след появата на симптоматиката. Събраните проби се съхраняват при температура от +4° до +8 °C и се транспортират до диагностичната лаборатория в

хладилни чанти с охладители. Желателно е материалът за изследване да пристигне в лабораторията до 24 часа след вземането на пробата. Ентеро- и пареховирусите запазват жизнеността си в продължение на няколко дни при температура 4-8°C. При невъзможност за бърз транспорт пробите се замразяват. Неколкократно замразяване и размразяване трябва да се избягва.

Серологичното изследване за ентеровируси не е от значима полза в клиничната практика (Landry, 2016), независимо че съществуват методи за детекция на специфични антиентеровирусни IgM и IgG антитела. Често е нужно изследване на две серумни проби (в острия и в рековалесцентния период) поради високата серопревалентност сред населението. Налице е и вероятност за фалшиво отрицателни серологични резултати, особено при пациенти, при които серумната проба е взета наскоро след появата на симптомите (< 7 дни) или такива, които са на имуносупресивна терапия.

### **Литература:**

1. Casaas-Alba, D., de Sevilla, M. F., Valero-Rello, A., Fortuny, C., Garcia-Garcia, J. J., Ortez, C., Muchart, J., Armangue, T., Jordan, I., Luaces, C., Barrabeig, I., Gonzalez-Sanz, R., Cabrerizo, Munoz-Almagro, C., Launes, C. (2017): Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in children's reference centre in Catalonia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 23(11), 874-881.
2. Debiasi, R. L., Tyler, K. L. (2004): Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 17(4), 903-925.
3. Dyrdak, R., Grabbe, M., Hammes, B., Ekwall, J., Hansson, K.E., Luthander, J., Naucler, P., Reinius, H., Rotzen-Ostlund, Albert, J. (2016): Outbreak of enterovirus D68 of the new B3 lineage in Stockholm, Sweden, August to September 2016. *Euro Surveill.*, 21(46):30403.
4. Landry, M. L. (2016): Immunoglobulin M for acute infection: true or false? *Clin. Vaccine Immunol.*, 23(7), 540-545.
5. Olijve, L., Jennings, L., Walls, T. (2018): Human parechovirus: an increasingly recognized cause of sepsis-like illness in young infants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 31(1), e00047-17.
6. Rieder, E., Gorbalenya, A. E., Xiao, C., He, Y., Baker, T. S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., Wimmer, E. (2001): Will the polio niche remain vacant? *Dev. Biol.*, 105, 111-122.
7. Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, M. J., McMinn, P., Ooi, M. H. (2010): Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis.*, 10:778-90.

### **16.14. Вирусни чревни инфекции**

Редица вируси, представители на различни вирусни семейства и родове, причиняват вирусни чревни инфекции и в частност вирусен гастроентерит. Това са норовируси, ротавируси, саповируси, чревни аденовируси (серотипове 40 и 41), астровируси, бокавируси, аичивируси, ентеровируси, косавируси, торовируси.

Диагностиката се основава на откриване на вирусен антиген чрез имуноензимен метод (antigen capture ELISA) или доказване на вирусна нуклеинова киселина (PCR, RT-PCR) във фекална проба, взета в рамките на 48 до 72 часа от появата на симптоматиката.

### 16.15. Респираторно-синцитиален вирус

Респираторно-синцитиалният вирус (РСВ) причинява бронхиолит и/или пневмония и се среща най-често при деца на възраст под 5 год., въпреки че може да причини респираторно заболяване при възрастни хора и тежка болест при имунокомпрометирани лица. Методи на избор в лабораторната диагностика са методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR), а предпочитани клинични проби за изследване са назофарингеални секрети или бронхоалвеоларен лаваж при пациенти с инфекция на долния респираторен тракт. Въпреки че РСВ може да се изолира в традиционни клетъчни култури, този подход е много продължителен – цитопатичен ефект (ЦПЕ) може да не се наблюдава в продължение на 2 седмици. При пациенти със суспектна РСВ инфекция серологични методи не се препоръчват. Серопревалентността към РСВ е висока и присъствието на IgG антитела показва минала инфекция и наличие на имунитет.

**Таблица 59. Лабораторна диагностика на инфекция с респираторно-синцитиален вирус**

Диагностични методи	Оптимални клинични проби	Услови на транспортиране
Методи на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR)	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа
Антиген-доказващи методи (имунофлуоресцентен или имуноензимен)	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа
Вирусни култури	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура или идеално в лед; <2 часа

### 16.16. Грипни вируси

Бързата диагноза на грипна инфекция ( $\leq 48$  часа от началото на симптомите) е необходима, за да улесни ранното прилагане на антивирусна терапия. Вирусът може бързо да бъде доказан в назофарингеални секрети чрез методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR) или директно доказване на вирусните антигени. Чувствителността на амплификационните методи е по-висока в сравнение с антиген-доказващите методи. По време на грипния сезон бързите скриниращи тестове могат да дадат фалшиво-негативни резултати (особено при доказване на пандемичния вирус H1N1 и свинските щамове H3N2). Пробите с отрицателни резултати трябва да бъдат потвърдени с молекулярни методи или вирусни култури за изключване на грипна инфекция. По време на сезоните със слабо разпространение на грипни вируси фалшиво-положителни резултати се срещат по-вероятно при използване на бързите антигенни тестове. Извършването на диагностични тестове за грип, включително

молекулярни и антиген-доказващи, варира в зависимост от метода и циркулиращите вируси. Молекулярните методи днес се разглежда като златен стандарт при доказването на грипни вируси в клинични проби. Грипните вируси могат да бъдат изолирани в рутинни клетъчни култури, но вирусното размножение трябва да бъде потвърдено чрез хемадсорбция и/или хемаглутинация. Серологичното изследване не е полезно за рутинната диагностика на грип поради високата серопревалентност в резултат на предишна инфекция и/или ваксинация.

**Таблица 60. Лабораторна диагностика на инфекция с грипни вируси А и В**

Диагностични методи	Оптимални клинични проби	Услови на транспортиране
Методи на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR)	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа
Антиген-доказващи (имунофлуоресцентен или имуноензимен) методи	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа
Вирусни култури	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура или идеално в лед; <2 часа

### 16.17. Аденовируси

В предишно здрави лица аденовирусите могат да причинят леко, самоограничаващо се респираторно заболяване или конюнктивит, като повечето случаи се диагностицират на базата на клиничните параметри. Понякога аденовирусната инфекция при имунокомпетентни лица може да доведе до смърт, особено при деца с астма. При имунокомпрометирани лица аденовирусите могат да причинят пневмония, дисеминирана инфекция, гастроентерит, хеморагичен цистит, менингоенцефалит, миокардит или хепатит. Диагностиката на аденовирусните инфекции се извършва с методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR), вирусни култури и/или хистопатология. Получаването на вирусни изолати върху клетъчни култури е бавен процес (~3 - 7 дни). Изследването на вирусен товар в кръвната плазма (чрез количествен PCR) може да бъде полезно като маркер за превантивна терапия, за диагностициране на симптомите и обективните данни на аденовирусната инфекция и с цел мониториране на отговора на антивирусна терапия при някои имунокомпрометирани пациенти.

**Таблица 61. Лабораторна диагностика на аденовирусна инфекция**

Диагностични методи	Оптимални клинични проби	Услови на транспортиране
Методи на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR)	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа

	тракт; фекална проба, конюнктивален секрет	
	Ликвор	Стерилна епруветка, стайна температура; <2 часа
	Плазма	Епруветка с EDTA, стерилна епруветка, стайна температура; ≤2 часа
Антиген-доказващи методи, бързи	Назофарингеални смивове; респираторни проби	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура; <2 часа
Антиген-доказващи методи (тип 40 и 41)	Фекална проба	Стерилен контейнер; стайна температура; <2 часа
Вирусни култури	Назофарингеални смивове/аспирати/промивни течности; гърлени смивове; проби от долния респираторен тракт, фекална проба, ликвор	Стерилен контейнер или вирусна транспортна среда; стайна температура или идеално в лед; <2 часа

### 16.18. Човешки коронавируси

Коронавирусите са специфични за гостоприемника и могат да инфектират различни животни, както и човек. Човешките патогени принадлежат към 4 рода: род Alphacoronavirus (229E и NL63), Betacoronavirus, линия А (OC43 и HKU1), линия В (коронавирус на тежкия респираторен синдром, SARS coronavirus) и линия С (коронавирус на блискоизточния респираторен синдром, MERS coronavirus). Човешките коронавируси 229E, NL63, OC43 и HKU1 причиняват ОРЗ, протичащо с ринорея, запушен нос, възпалено гърло, кихане, кашлица, с възможен фебрилитет. При деца могат да причинят екзацербация на астма и отит на средното ухо. Най-подходящи проби за изследване са респираторните секрети или назофарингеалните смивове, поставени в подходяща вирусна транспортна среда. Диагностиката включва методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR), които могат да бъдат част от търговски респираторни панели. Суспектните случаи на SARS и MERS изискват незабавно съобщаване в лабораторията. Ръководства за тестване могат да бъдат намерени в сайтовете [www.cdc.gov/sars/index.html](http://www.cdc.gov/sars/index.html) и [www.cdc.gov/coronavirus/MERS/index.html](http://www.cdc.gov/coronavirus/MERS/index.html).

### 16.19. Парагрипни вируси

Парагрипните вируси са важни причинители на круп (ларинготрахеобронхит), бронхиолит, пневмония, както и на инфекции на горните дихателни пътища. От 4-те антигенни типа, типовете 1 и 2 най-често се асоциират с круп, докато тип 3 се асоциира най-често с бронхиолит и пневмония. Инфекциите с парагрипни вируси наброяват до 11% от всички хоспитализации при деца на възраст под 5 год. [Mejas, 2012]. Най-подходящи проби за изследване са респираторните секрети или назофарингеалните смивове, поставени в подходяща вирусна транспортна среда. Диагностичните методи включват вирусни култури, които могат да отнемат 4-7 дни, и методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR), които могат да бъдат част от търговски респираторни панели.

### 16.20. Човешки метапневмовирус



Човешкият метапневмовирус причинява ОРЗ при лица от всички възрасти. Той се асоциира с бронхиолит при деца на възраст под 2 год., както и с пневмония, екзацербация на астма, круп, ОРЗ на горните дихателни пътища с отит на средното ухо при деца. Най-често децата развиват от леки до умерено тежки симптоми. При възрастни пациенти причинява екзацербация на хронична обструктивна белодробна болест (ХОББ) и пневмония. Когато се изисква лабораторно изследване, подходящи проби са респираторните секрети или назофарингеалните смивове, поставени в подходяща вирусна транспортна среда. Диагностичните тестове включват имунофлуоресцентния метод и методите на амплификация на вирусната нуклеинова киселина (PCR), които могат да бъдат част търговски респираторни панели.

## Литература

1. Mejias A, Ramilo. Parainfluenza viruses. In: Long S, Pickering LK, Prober CG, eds. Principles and practice of pediatric infectious diseases, 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2012:1123–4.

### 16.21. Денга

Вирус Денга (DENV) е флавивирус, пренасян чрез комари от род *Aedes*. Най-често се свързва с фебрилно заболяване сред пътуващи, връщащи се от ендемични региони (напр. Южна и Централна Америка, Азия, Карибските острови). Диагностиката на DENV се базира предимно на серологични методи за детекция на специфични IgM и/или IgG антитела или детекция на антигена на неструктурния протеин 1 на вируса (NS1) (Таблица 62). При първична инфекция IgM антитела се откриват 3-5 дни след появата на симптоми и се задържат 2-3 месеца. Антитела от клас IgG се появяват 10-12 дни след появата на симптомите и могат да се задържат с години. При вторична DENV инфекция е възможно да не се откриват IgM антитела. При пациенти, суспектни за денга, показали първоначално отрицателен серологичен профил, е необходимо повторно изследване на серумна проба 7-10 дни след появата на симптомите. Сероконверсия към анти-DENV IgM и/или IgG серопозитивност е почти сигурен показател за скорошна инфекция. Поради подобния антигенен профил между вирусите от род *Flavivirus* обаче, са възможни и фалшиво-положителни серологични резултати при пациенти с предходна флавивирусна инфекция (напр. Западнонилска треска, Зика вирус). Златният стандарт за детекция на антитела при арбовируси е тестът за доказване на неутрализиращи антитела в серума на болния (PRNT), който предлага по-голяма специфичност пред търговските серологични тестове. Поради сложността си обаче, PRNT се извършва само в някои лаборатории.

След инфекция с DENV, времето продължава 4-6 дни след появата на симптомите. Въпреки, че е възможна вирусна изолация в този период, този метод не се прилага рутинно. Детекция на DENV РНК чрез тест за амплификация на нуклеинови киселини (NAAT) се препоръчва при пациенти в остра фаза на заболяването. Отскоро детекцията на NS1 антигена, който се секретира от инфектираните клетки още от първия ден от появата на симптомите и до 10-я ден след това, се превърна в допустима алтернатива на NAAT за диагностиката на остра DENV инфекция.

**Таблица 62. Лабораторна диагностика на Денга вирусна инфекция**

Диагностична процедура	Оптимална проба	Метод и оптимално време за транспортиране
Серология	серум	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч
NS1 антиген	серум	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч
NAAT	ликвор	стерилна епруветка, СТ, <2ч
	плазма	EDTA или епруветка за плазма, СТ, <2ч
	серум	епруветка с гел сепаратор, СТ, <2ч

Съкращения: EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, NAAT – тест за амплификация на нуклеинови киселини, СТ – стайна температура

### 16.22. Западнонилска треска

Вирусът на Западнонилската треска (WNV), заедно с някои други арбовируси, може да предизвика инфекции на ЦНС. Лабораторната диагностика на WNV и повечето други арбовируси, обикновено се постига чрез детекция на вирус-специфични антитела от класовете IgM и/или IgG в серума и/или ликвора. Антитела от клас IgM могат да се открият 3-8 дни след появата на симптомите и обикновено изчезват 2-3 месеца по-късно, макар че има документирани случаи на персистиране на тези антитела в продължение на 12 месеца. Сероконверсия към анти-WNV IgM и/или IgG позитивност на серумите между острата и конвалесцентната фаза (взети в разстояние 7-10 дни) говори за скорошна инфекция с WNV. Наличието само на IgG антитела в началото на инфекцията говори за предишна WNV инфекция, поради което е желателно търсенето на алтернативна етиология. Серологична диагностика на неврологична WNV инфекция може да се осъществи чрез детекция на IgM антитела в ликвора, тъй като антитела от този клас не преминават през кръвно-мозъчната бариера. Въпреки това, навлизането на кръв в ликвора по време на травматична лумбална пункция, както и дефектна пропускливост на кръвно-мозъчната бариера могат да доведат до фалшиво повишени нива на IgM антителата в ликвора. Фалшиво-положителни резултати за IgM и IgG антитела срещу WNV могат да се появят при пациенти ваксинирани срещу жълта треска или претърпели друга флавивирусна инфекция (напр. Денга). За да се изключи възможността за кръстосана реакция, се препоръчва потвърждаването на антителата чрез PRNT (вируснеутрализираща реакция).

Детекцията на РНК на WNV чрез NAAT в серума и ликвора е по-чувствителен метод при имунисупресирани пациенти поради забавения имунен отговор и по-продължителната виремия. Вирусното култивиране е възможен, но не толкова чувствителен метод и не се провежда рутинно.

**Таблица 63. Лабораторна диагностика на Западнонилска треска**

Диагностична процедура	Оптимална проба	Метод и оптимално време за транспортиране
Серология	серум	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч
NAAT	ликвор	стерилна епруветка, СТ, <2ч
	Плазма	EDTA или епруветка за плазма, СТ, <2ч
	серум	епруветка с гел сепаратор, СТ, <2ч

Съкращения: EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, NAAT – тест за амплификация на нуклеинови киселини, СТ – стайна температура

### 16.23. Лимфоцитарен хориоменингит

Вирусът на Лимфоцитарния хориоменингит (LCMV) е вирус, пренасян чрез гризачи. Може да предизвика менингоенцефалит и да бъде животозастрашаващ при имunosупресирани пациенти. Основният метод за диагностика на инфекция с LCMV е серологичният тест. Обикновено се доказва 4-кратно или по-голямо нарастване в титрите на IgG антителата между острата и реконвалесцентната фази или се доказва наличието на анти-LCMV IgM антитела. Детекцията на антитела в ликвора говори за инфекция на ЦНС; могат обаче и да се открият, ако ликворът бъде контаминиран с кръв по време на вземането на пробата или при пренос на антитела през кръвно-мозъчната бариера. РНК на вируса може да бъде открита чрез NAAT, но този тест се извършва в малко лаборатории.

**Таблица 64. Лабораторна диагностика на Лимфоцитарен хориоменингит**

Диагностична процедура	Оптимална проба	Метод и оптимално време за транспортиране
Серология	серум	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч
серология	серум ликвор	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч стерилна епруветка, СТ, <2ч

Съкращения: СТ – стайна температура

### 16.24. Зика

Вирус Зика (ZIKV) е член на род *Flavivirus* и се пренася чрез комари от род *Aedes*. Често се свързва с конгенитални вродени дефекти, включително и микроцефалия. Диагностиката на ZIKV включва детекция на РНК чрез NAAT, детекция на IgM антитела срещу вируса и PRNT, считан за златен стандарт за детекция на неутрализиращи антитела срещу арбовируси. Изборът на метод зависи предимно от времето между появата на симптомите и вземането на пробата, както и от последната възможна експозиция на ZIKV. Понастоящем се препоръчват молекулярни методи за детекция на РНК в серума и урината при пациенти със симптоми и бременни жени с продължителност на заболяването не повече от 14 дни. Положителният резултат от NAAT за ZIKV е показателен за инфекция, отрицателният резултат обаче не изключва възможността за инфекция, тъй като вiremията или вирурията могат да са преминали. При пациенти с отрицателен NAAT тест за ZIKV, особено при бременни жени, е необходимо провеждането на серологични тестове за доказване на антитела. Фалшиво-положителни IgM антитела срещу вируса могат да се появят при пациенти с предишна или настояща инфекция с близкородствени флави вируси, включително WNV и DENV. Затова доказването на IgM антитела не е достатъчен резултат за предприемането на клинични мерки. Необходимо е потвърждаването на неутрализиращи антитела чрез PRNT. Също така, трябва да се прецени вероятността за денга- и чикунгуния- вирусна инфекция, поради едновременната циркулация на тези вируси в ендемичните за Зика региони, както и поради подобната симптоматика при тези арбовируси.

**Таблица 65. Лабораторна диагностика на Зика вирусна инфекция**

Диагностична процедура	Оптимална проба	Метод и оптимално време за транспортиране
Серология	серум	епруветки с активатор на съсирването, епруветки с гел сепаратор, СТ, < 2ч
	ликвор	стерилна епруветка, СТ, <2ч
NAAT	ликвор	стерилна епруветка, СТ, <2ч
	плазма	EDTA или епруветка за плазма, СТ, <2ч
	серум	епруветка с гел сепаратор, СТ, <2ч
	урина	стерилна епруветка, СТ, >2ч
	кръв	EDTA или цитратна епруветка, СТ, <2ч

Съкращения: EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, NAAT – тест за амплификация на нуклеинови киселини, СТ – стайна температура