Диагностика ToRCH-инфекций

Способы повышения специфичности тест-систем ЦМВ IgM

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИО

ToRCH-инфекции

To-

Toxoplasma

R-

Rubella

C-

Cytomegalo virus

H-

Herpes simplex virus

T – Toxoplasma (токсоплазмоз)
O- расшифровка «O» как «others», т.е. «другие» инфекции.
R – Rubella (краснуха)
C – Cytomegalovirus (цитомегалия)
H – Herpes simplex virus (герпес простой 1,2 типов)
Термин предложен в 1971 г. Andre J. Nahmias и используется ВОЗ.
Все эти заболевания могут объединяться термином «внутриутробные инфекции».

Принципы объединения ToRCH-инфекций в группу

- Трансплацентарное заражение плода при первичной инфекции, тератогенное действие на плод
- Способность к длительной персистенции в организме без выраженных клинических проявлений
- Сходные клинические проявления ВУ
- Сходные принципы лабораторной диагностики

АКТУАЛЬНОСТЬ ИНФЕКЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ ВО ВСЕМ МИРЕ ОЧЕВИДНА:

Глобальная ежегодная заболеваемость врожденным токсоплазмозом оценивается на уровне 190 100 случаев. Это эквивалентно бремени 1,2 млн. потерянных лет жизни, скорректированных на инвалидность

who.int›
САЙТ ВОЗ

360 миллионов человек в мире страдают от инвалидизирующей потери слуха, из них 32 миллиона детей. Причина потери слуха-ВУИ

По оценкам, во всем мире вирусом ВПГ-1 инфицированы около 3,7 миллиарда человек (67% населения).

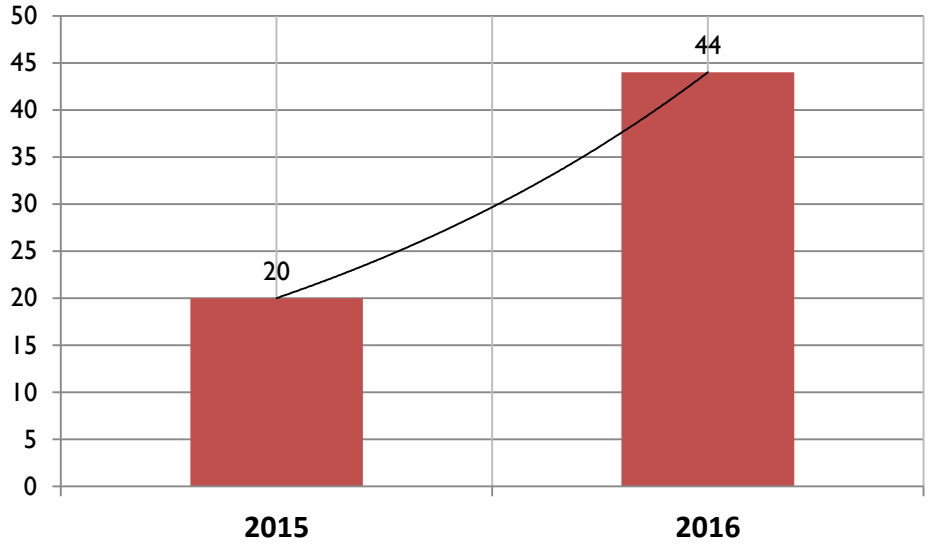
Достижения 2015: Регион Америки стал первым регионом, ликвидировавшим краснуху

К концу 2020 г.
Завершить ликвидацию краснухи, по меньшей мере, в 5 регионах ВОЗ.

АКТУАЛЬНОСТЬ ДИАГНОСТИКИ ToRCH в РФ действительна и поддерживается законодательно:

- **Пр. МЗ РФ от 12.11.2012 № 572 н «Порядок оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных, репродуктивных технологий)»**, ***Приказ № 808 отменен; № 50 вошел в действующий №572***
- ***Пр. МЗ РФ от 30.08.2012 №107н, Распоряжение Комитета по здравоохранению от 26.01.2015 №9-р (о репродуктивных технологиях).***

Краснуха-показатели заболеваемости в РФ 2015-2016 (рост в 2,2 раза)



РФ-Вступление в действие Постановления № 102 (и др. законодательных документов о преференциях)

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИО

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ToRCH-инфекций:

Способ определения инфекционного агента

ПРЯМЫЕ МАРКЕРЫ

РИФ, ИГЦХ, ПЦР и др.

НЕПРЯМЫЕ МАРКЕРЫ

Определение специфических антител IgG и IgM (концентраций, динамики титров, степени созревания) к антигенам **ИФА**, ИХЛА, ИБ и др.

ВИД ИССЛЕДОВАНИЯ

СКРИНИНГ

ИФА, ИХЛА, и др.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ

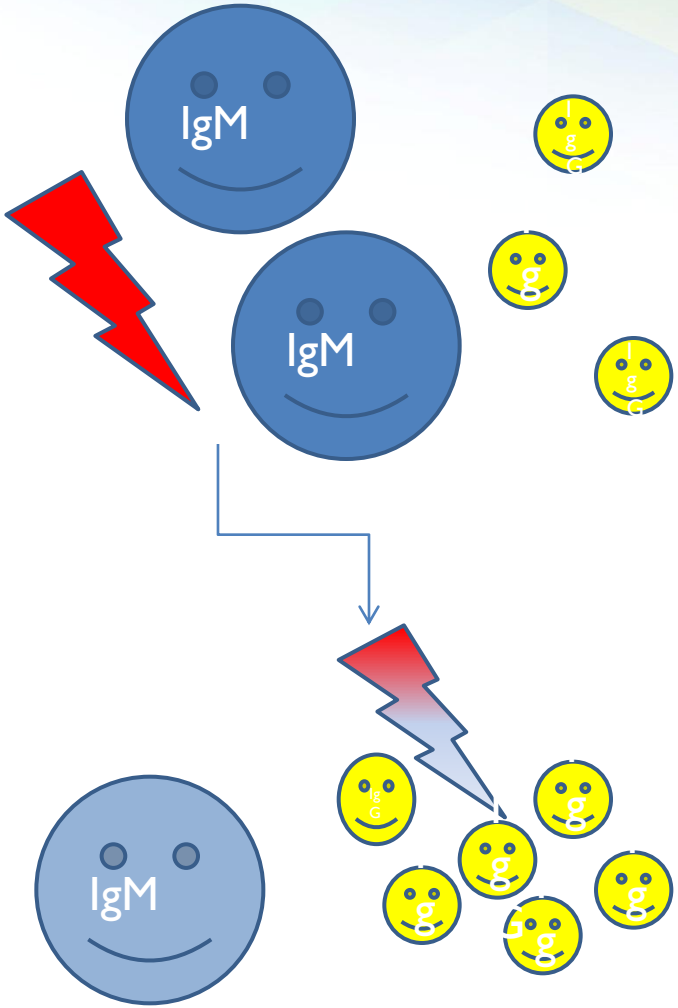
ИБ, ПЦР, определение ИА,

. **Антиген** - структурный элемент вирусной (микробной) частицы.

Антитела - это белки сыворотки крови (иммуноглобулины –) и других биологических жидкостей, которые вырабатываются в ответ на введение чужеродных органических веществ (антигенов).

Сила иммунного ответа при любой инфекции нарастает постепенно, поэтапно вовлекая каждый из компонентов иммунной системы на определенной стадии заболевания.

Выявив активность отдельного звена иммунитета, можно судить о давности инфицирования.



Авидность – степень прочности связывания специфических антител с антигеном, против которого направлены эти антитела, **(сила кооперативных взаимодействий Av=Σ(af1 +af2+afn…+))**

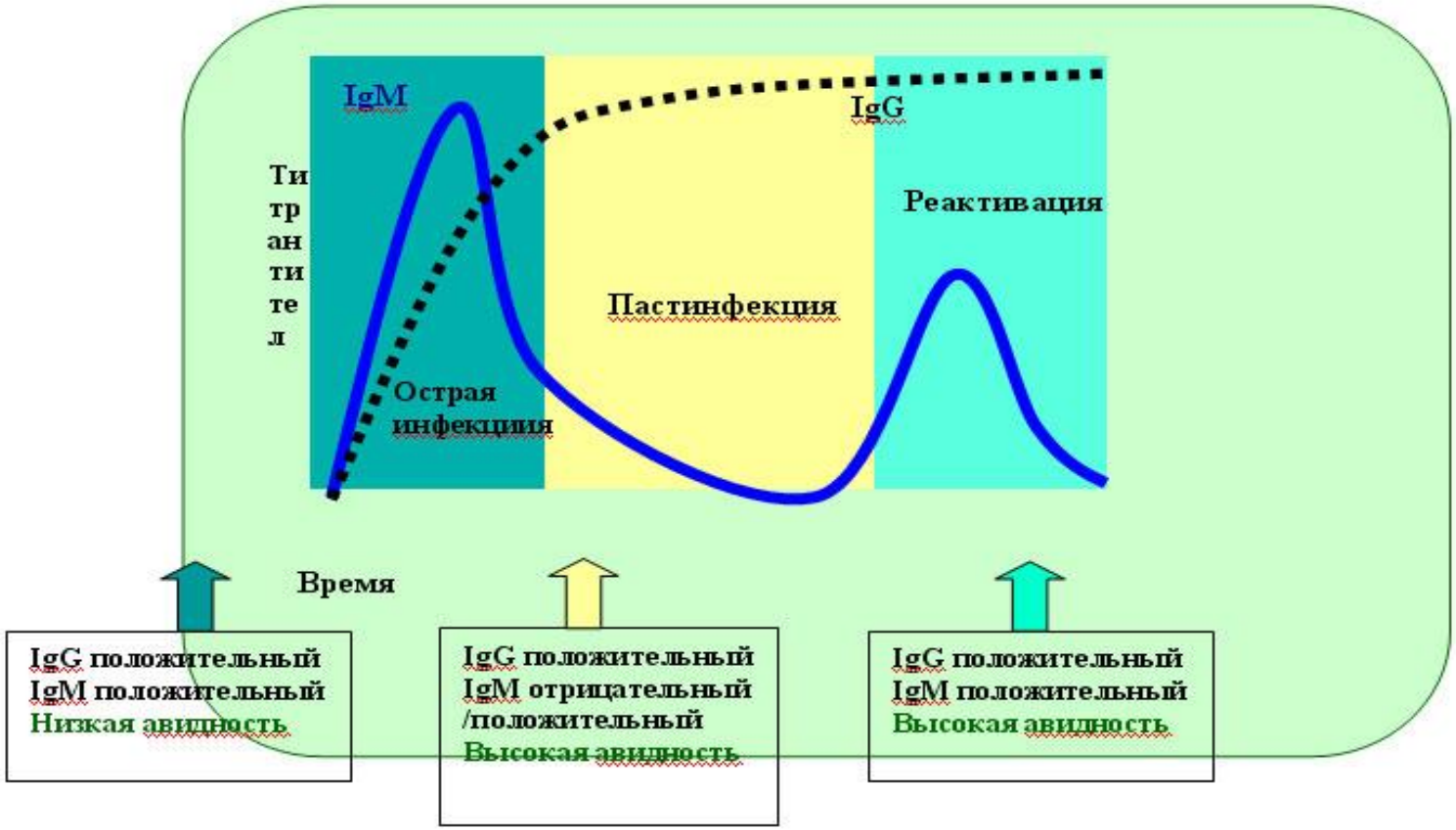
Высокоавидные

Низкоавидные

Высокая **Низкая**

Специфичность-способность антител распознавать определенный тип эпитопов молекулы антигена и взаимодействовать с ним **(ключ-замок)**

Свойства антител



IgG	IgM	Авидность	Диагноз
Отрицательный	Отрицательный		Нет инфекции
Положительный	Положительный	Низкая	Острая инфекция
Положительный	Положительный	Высокая	Реактивация
Положительный	Отрицательный	Высокая	Пастинфекция

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИО

Согласно РЕКОМЕНДАЦИЯМ Ассоциации врачей США (CDC)

Современным требованиям скрининговой диагностики ToRCH-инфекций отвечают алгоритмы, включающие:

-Одновременное тестирование сыворотки на весь комплекс ToRCH-инфекций (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирусная инфекция, герпес и др.)

-Одновременное определение в сыворотке IgG и IgM-антител

-Количественный метод определения IgG-антител (в Международных единицах):

-Определение IgM антител с использованием технологии «μ-capture» (μ-захвата):

-Определение авидности IgG антител

АЛКОР БИО ПРЕДСТАВЛЯЕТ НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ToRCH-инфекций методом ИФА под маркой Radim

ТРАНСФЕР ИТАЛЬЯНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ НА ПЛОЩАДКЕ АЛКОР БИО!

ИТАЛЬЯНСКОЕ КАЧЕСТВО –РОССИЙСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО, РУ РФ– достойное европейское импортозамещение!

UKAS ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
ISO 9001
Certificate № RU 227131

CE

«Вы можете быть российской компанией, но МИРОВОГО класса!» Philip Kotler

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИО

ToRCH-Radim:
классификация по трем сходным схемам постановки

IgM-«capture»

- **To**xoplasma «Токсоплазма IgM»
- **R**ubella «Краснуха IgM»
- **C**ytomegalovirus «ЦМВ IgM»

IgG кач./колич

- **To**xoplasma «Токсоплазма IgG»
- **R**ubella «Краснуха IgG»
- **C**ytomegalovirus «ЦМВ IgG»

IgG авидность

- **To**xoplasma «Токсоплазма IgG-авидность»
- **R**ubella «Краснуха IgG-авидность»
- **C**ytomegalovirus «ЦМВ IgG-авидность»

Кач./колич. IgG “Radim”

Toxoplasma «Токсоплазма IgG»
Rubella «Краснуха IgG»
Cytomegalovirus «ЦМВ IgG»

ДВУХСТАДИЙНЫЙ «СЭНДВИЧ»

Общее время основных инкубаций 60+30 мин

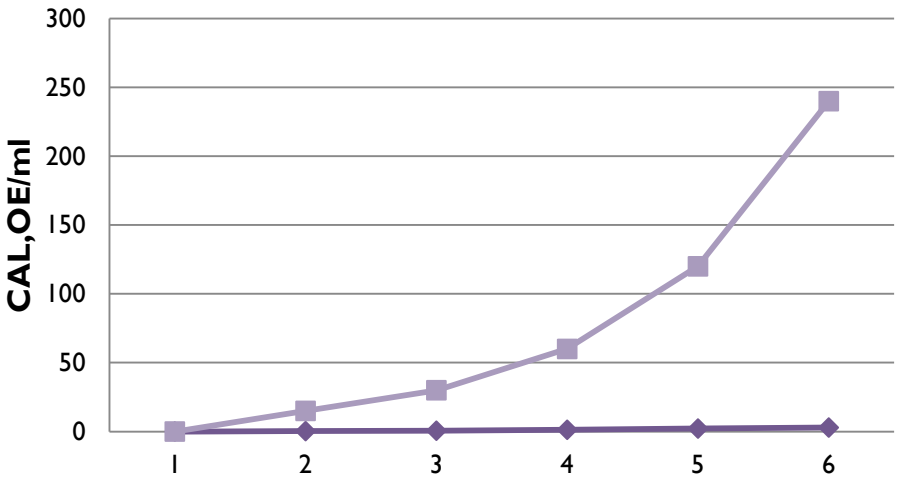
(планшет заклеен пленкой)

Готовый Cut-Off и CAL

Качественный анализ: **Rubella**

ОП neg CAL 0
ОП Cut-Off CAL 15
Если ОП < ОП Cut-Off не реактивны

Калибровочная кривая

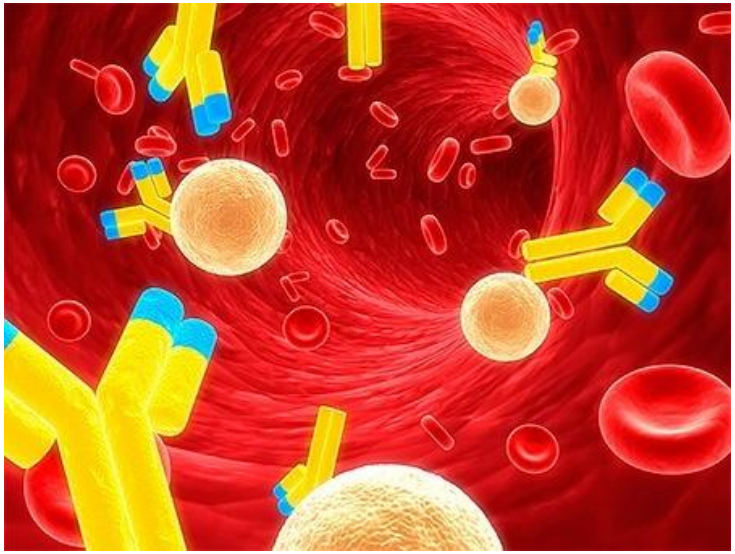


Количественный анализ

450 nm CAL аттестованы по **Международным стандартам Rubella**

CAL 0 МЕ/мл 0.015
CAL 15 МЕ/мл 0.309
CAL 30 МЕ/мл 0.591
CAL 60 МЕ/мл 1.280
CAL 120 МЕ/мл 2.170
CAL 240 МЕ/мл 2.898

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИ



IgG Avidity “Radim”

Toxoplasma «Токсоплазма IgG-авидность»
Rubella «Краснуха IgG-авидность»
Cytomegalovirus «ЦМВ IgG-авидность»

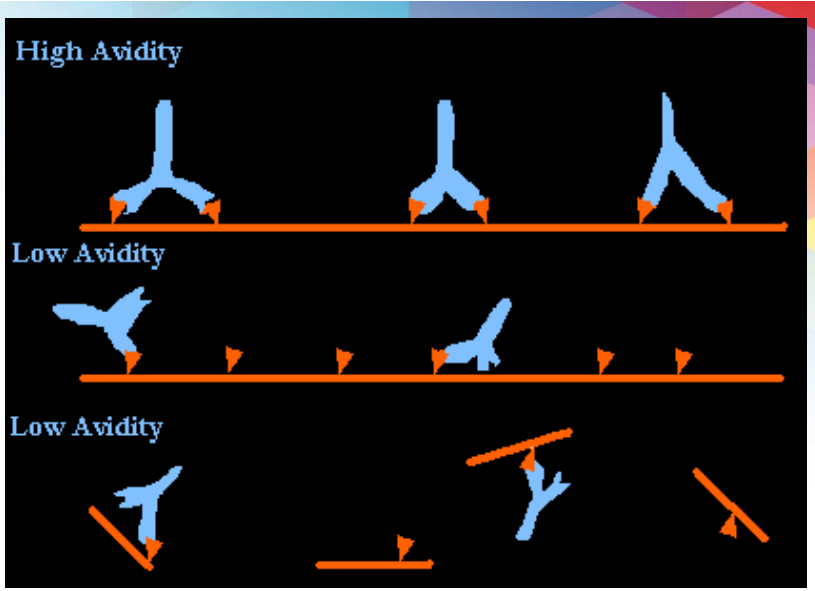
трехстадийный «сэндвич»

Время основных инкубаций:
60+30(60 Тохо)+30 мин

Предварительное разведение сывороток(1:300)
Планшет с АГ; образцы в дубликатах; Низкоавидный и Высокоавидный контроли
Важна инкубация - с реагентом для диссоциации (мочевиной) для удаления низкоавидных тел
К avid (%)= (ОП с реагентом для диссоциации / ОП без обработки) х100
Для краснухи :
ИА < 40% - низкая авидность
ИА 40-60% - промежуточная авидность
ИА > 60% - высокая авидность

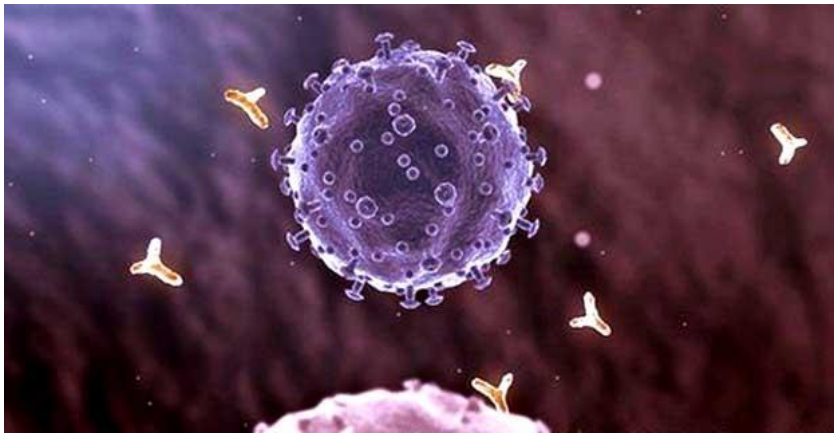
IgG Avidity “Radim”

Схематическое изображение принципа ИФА-выделения низкоавидных антител



DISS-

Реагент для диссоциации - раствор с мочевиной удаляет низкоавидные тела



Качественный IgM “Radim”

Toxoplasma «Токсоплазма IgM»
Rubella «Краснуха IgM»
Cytomegalovirus «ЦМВ IgM»

ТРЕХСТАДИЙНЫЙ «СЭНДВИЧ»
Общее время основных инкубаций
60+60+30 мин
(планшет заклеен клейкой бумагой)

Готовый Cut-Off

ВСЕГДА МЕТОД «μ-capture»
(μ-захвата)

Все лаборатории Санкт-Петербурга подтверждают сомнительные результаты для беременных в больнице им. Боткина -ГОРОДСКОЙ КОНСУЛЬТАТИВНО - ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР (ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ),

лучшая экспертная лаборатория СПБ выбирает ТЕСТ-СИСТЕМЫ для диагностики ToRCH-инфекций бренда Radim производства Алкор Био

ПОЧЕМУ ЛУЧШИЕ ЭКСПЕРТНЫЕ ЛАБОРАТОРИИ Санкт-Петербурга рекомендуют тест-системы ToRCH-Radim как альтернативу ИММУНОБЛОТУ?

ЧТО ОПРЕДЕЛЯЕТ ВЫСОКУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ тест-систем ToRCH-Radim?

Рассмотрим на примере самого сложного и самого важного для диагностики ToRCH вида теста:

ЦМВ IgM Radim

N.B.! Присутствие антигенспецифических IgM дает возможность выявить период острой фазы быстро по единственному образцу сыворотки!

Чаще всего лаборатории при определении IgM ЦМВ сталкиваются с двумя проблемами:

Много ЛП и есть ЛО
(Низкая специфичность
и
недостаточная чувствительность)
почти у всех применяемых в лабораториях тестов на ЦМВ

Возможные причины ЛО (низкой чувствительности) тест-систем ЦМВ IgM:

1.IgG после перенесенной (латентной) инфекции могут успешно конкурировать за антиген с IgM, образовавшимся в ответ на новую инфекцию (IgG меньшего размера, чем IgM).

Возможные причины ЛП (низкой специфичности) тест-систем:

1. Ревматоидный фактор (РФ- аутоантитела преимущественно класса IgM).
В «сэндвиче» РФ может связывать IgG и образовывать перекрестный комплекс.

2. Вирус герпеса (HSV) и вирус Эпштейна-Барра эволюционно родственны ЦМВ и имеют с ним множественные общие антигенные детерминанты

«Использование разных форматов определения IgM при диагностике инфекционных заболеваний» Чарлз Ли и соавторы

АНТИТЕЛА: особенность IgM –большой размер молекулы затрудняет выделение обычным методом

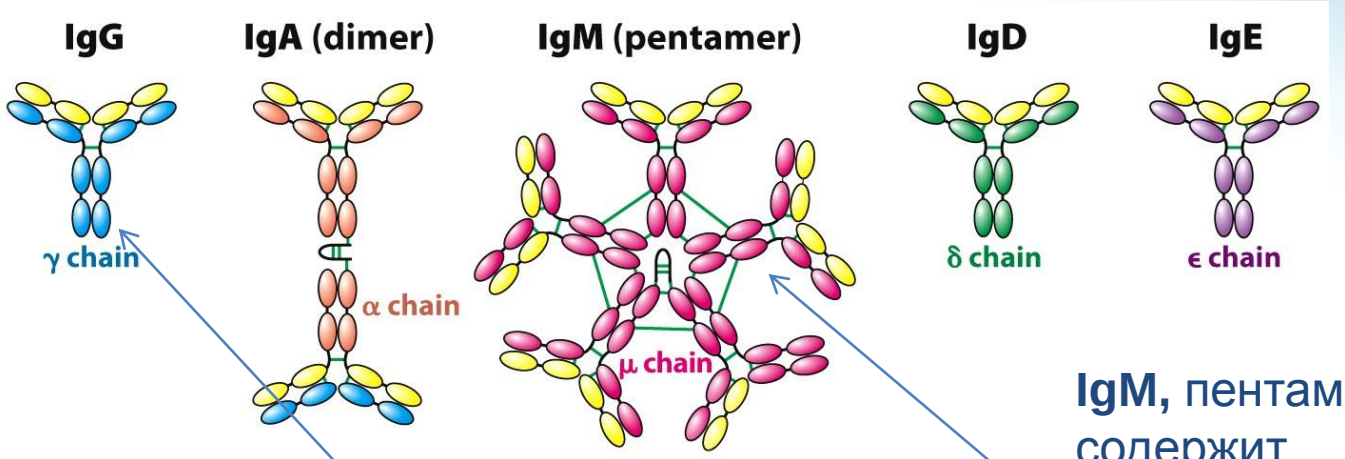
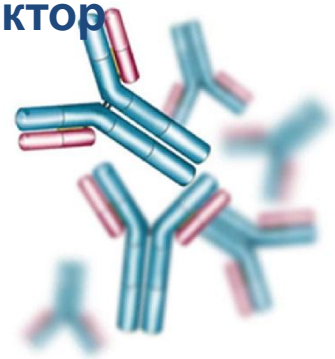
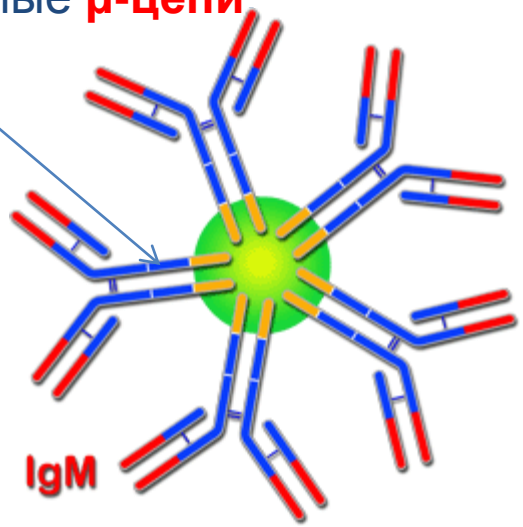


Figure 34.8
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

IgM, пентамер, содержит тяжелые **μ-цепи**

IgG
и рематоидный фактор
содержат
γ-цепи





Метод «μ-capture» «ЦМВ IgM» Radim - воздействие на μ-цепь IgM

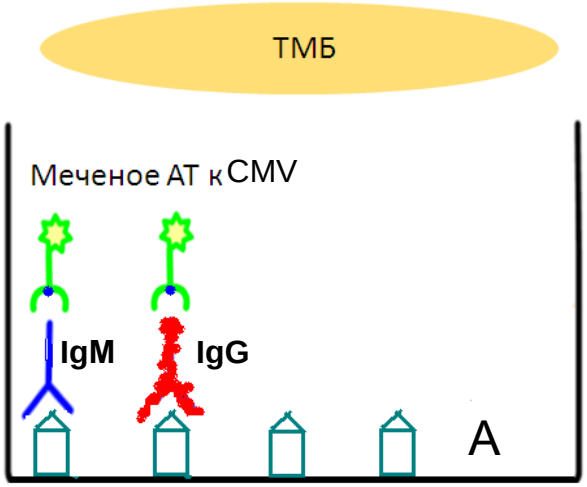
На планшете :

антитела против μ-цепей антител IgM

Варианты ИФА-анализа

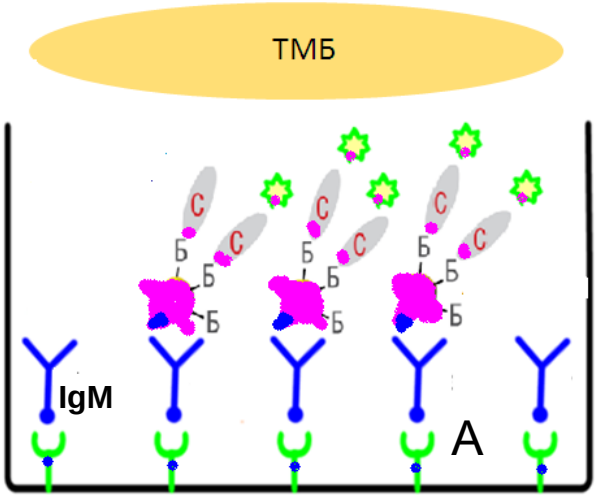
А-планшет
Б -антиген ЦМВ
С-Биотин
- Стрептавидин с меткой

«сэндвич»



Просто антиген

«capture»-вариант



Специфические антитела к μ -IgM

Что дает «**μ-capture**»?

Это указано в инструкции к тест-системе «ЦМВ IgM» Radim:

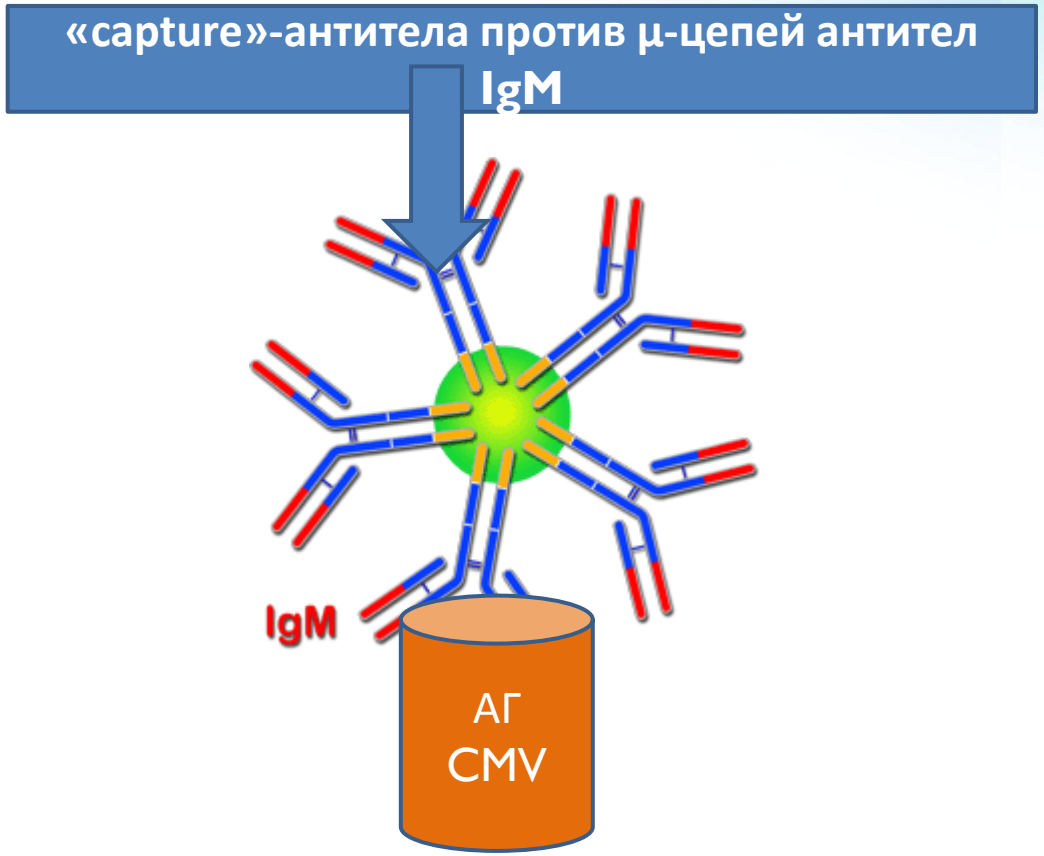
- полный захват всех IgM-(**μ-цепь IgM)**
- исключение ревматоидного фактора путем исключения всех IgG, в т.ч. в составе РФ

Что убирает перекрёст других герпесвирусов?

Снижают специфичность (ЛП) родственные герпесвирусы: Вирус простого герпеса, Эпштейна-Барр, ветряной оспы

Лиофилизат антигена CMV
при внесении в биотин! (конъюгат N1)
позволяет полностью
убрать перекрестное влияние в тест-системе
«ЦМВ IgM» Radim !

ЧЕТКИЙ «СЭНДВИЧ»-только IgM к CMV «ЦМВ IgM» Radim



N.B.! Эти особенности позволяют использовать в ТЗ для тендеров в качестве уникальной тест системы «ЦМВ IgM» Radim

ВЫБИРАЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДИКИ, N.B!

«capture» не во всех ТЕСТ-СИСТЕМАХ дает оптимальную чувствительность!

Что повышает чувствительность в тест-системах Radim?
СПОСОБ КОНЪЮГАЦИИ!

ТОЛЬКО «μ-capture»
+ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ИНКУБАЦИИ С ДВУМЯ КОНЪЮГАТАМИ ВАЖНЫ ДЛЯ ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ!

1Конъюгация с биотином → 2Конъюгация со стрептавидином

Тест-система «ЦМВ IgM» Radim

≠

одна конъюгация с одним конъюгатом
другие тест-системы

Дополнительные приемы совершенствования ИФА тест-систем (Вашукова С.С. Доклад на МИАЦ,ноябрь 2016, на сайте МИАЦ, 4 сентября 2017)

«Для повышения чувствительности и специфичности:

1) Многостадийность вообще (2-х и более стадийные наборы обладают лучшими диагностическими характеристиками)
2) Для усиления сигнала (чувствительности) без потери специфичности используют систему биотина – стрептавидина, основанную на высоком родстве этих компонентов: биотин - низкомолекулярный растворимый витамин, стрептавидин – бактериальный белок.

Система биотин-стрептавидин (БС), дающая дополнительные участки связывания, используется в реагентах для автоматических анализаторов (фирм Roche, Abbott и др.)»

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ИНКУБАЦИИ

вначале с конъюгатом -1-биотин,

затем с конъюгатом- 2- стрептавидин –дают усиление сигнала как

ОСНОВНОЙ ФАКТОР высокой чувствительности!

Два разных типа инкубаций с конъюгатами

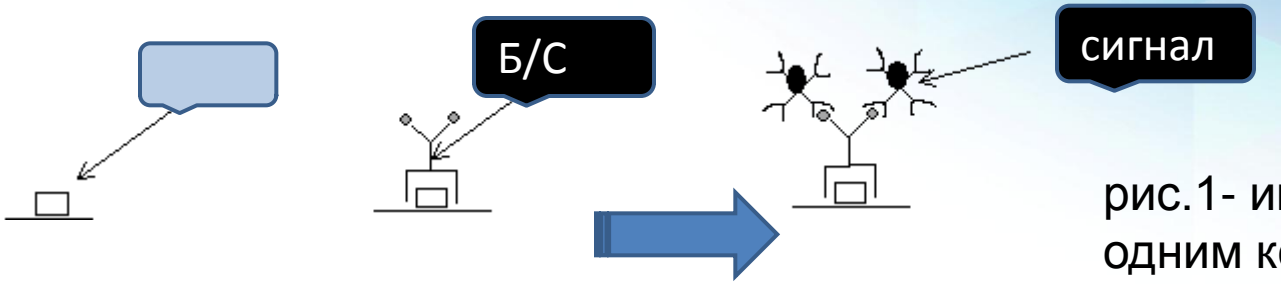


рис.1- инкубация с одним конъюгатом Б/С-Биотин/Стрептавидин

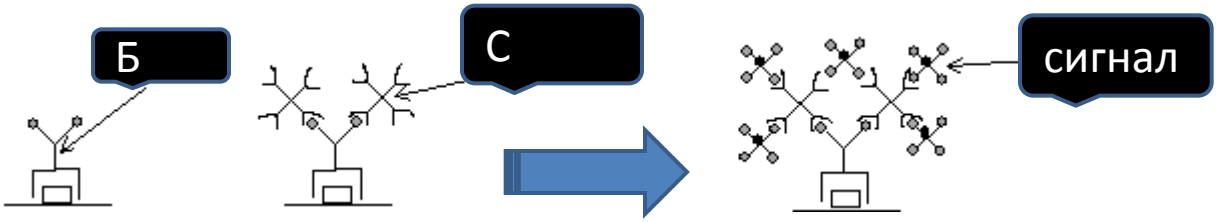


рис.2- две последовательные инкубации с конъюгатами: Б-биотин, потом С-стрептавидин

«… происходит многократное усиление сигнала»
Наталья Кузьмина « Моноклональные антитела» рис.2

увеличение чувствительности

ВСЕ тест-системы ToRCH-Radim многостадийны, это обосновано последовательностью инкубаций!

«ЦМВ IgM» Radim:

1 инкубация- **«capture»** воздействие **на μ-цепь IgM**
2 инкубация - лиоф. **Антигена ЦМВ + конъюгат биотин**
3 инкубация - с меткой **конъюгат стрептавидин**

Длительность постановки – ряд последовательных инкубаций- гарантия качества наборов Radim

60 мин

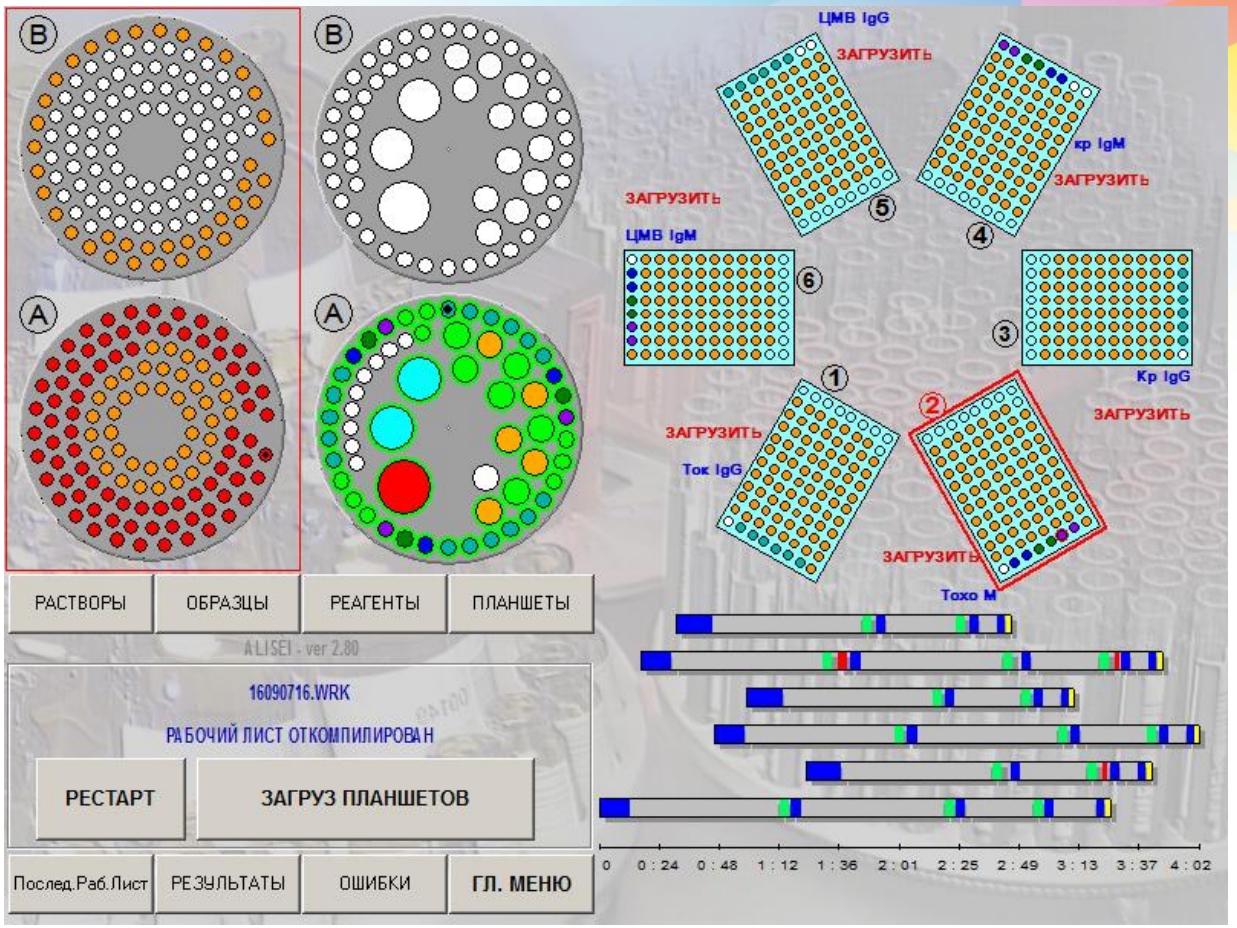
Все, кроме Radim:
- **ЛП (по 10 с планшета)**
- **Лишние реагенты**
- **Ложные диагнозы**
- **Время для перестановки 1 час-1,5 часа**

ЧТО ДЛЯ ВАС ВАЖНЕЕ?

ToRCH-Radim –это дополнительно:

- **Универсальные схемы постановки и универсальные реагенты** дают возможность определения антител каждого класса IgG (IgM, IgG авидность) всех ToRCH-инфекций за одну сессию при одном разведении сывороток
- **Готовый Cut-Off вместо расчетного** –точная граница отсечения – ОП кр.
- **Готовые калибраторы** аттестованные по Международным стандартам (Стандарт WHO, Internationale Standart PEL, Института Пауля Эрлиха) –новая ступень точности теста важно для IgG
- **Длительные сроки хранения рабочих растворов** контролей (2 мес) и буферов (1мес)-важно для, IgG авидность

Возможности Alisei Q.S. –диагностика ToRCH



За одну сессию возможна постановка 80 сывороток на ЦМВ, Токсо и Rubella (IgM и IgG)

За одну сессию возможна постановка 45 сывороток на ЦМВ, Токсо и Rubella (IgG и IgG авидность)

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ТЕЗИСЫ

Тест-системы ToRCH-Radim
разработаны и воспроизведены Алкор Био
как **оптимальный формат** теста для связывания и детекции специфичных антител.

Элиминация IgG и ревматоидного фактора при определении IgM и отсутствие влияния
«перекрестных» вирусов
в сочетании с оптимальной чувствительностью, обеспечиваемой многостадийностью

значительно повышает достоверность результата.

Теоретическое обоснование высокой эффективности

-отличный стимул к апробации тест-систем ToRCH-Radim!

Благодарю за Ваше внимание!

Крылова Ольга, тел. 453
руководитель проекта
«Инфекционная диагностика»
ООО Алкор Био

ГРУППА КОМПАНИЙ АЛКОР БИО