

### ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ TORCH-ИНФЕКЦИЙ

СПБ ГБУЗ «ГОРОДСКОЙ КОНСУЛЬТАТИВНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР (ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ)»

ГЛАВНЫЙ ВРАЧ – ВАШУКОВА С.С., КАНД.МЕД.НАУК

17 ноября 2016

### TORCH-КОМПЛЕКС (ВНУТРИУТРОБНЫЕ ИНФЕКЦИИ)

ТЕРМИН ПРЕДЛОЖЕН В 1971 Г. ANDRE J. NAHMIAS



O – «Others»- другие\*

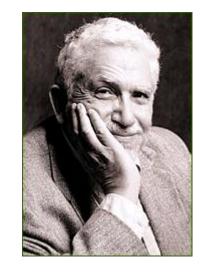
R – Rubella (краснуха)

C – Cytomegalovirus (цитомегалия)

H – Herpes simplex virus (герпес простой 1,2 типов)

\*первоначально - сифилис, затем - вирусные гепатиты В, С, ВИЧ, ветряная оспа, мононуклеоз, энтеровирусы, парвовирус В19 и ряд бактериальных инфекций-листериоз и др.

Принципы объединения в группу:



- **1.**Трансплацентарное заражение плода
- 2. Зависимость тяжести тератогенного эффекта от срока беременности (в І тр.- тяжелые пороки развития (гибель), во II-III тр. множественные органные поражения)
- 3. Сходные клинические проявления при внутриутробном инфицировании плода

## ГРУППЫ ЛИЦ, ПОДЛЕЖАЩИЕ ОБСЛЕДОВАНИЮ (В СООТВЕТСТВИИ С ДЕЙСТВУЮЩИМИ ДОКУМЕНТАМИ)\*

- 1. Женщины, планирующие беременность (здоровые беременные женщины)
- 2. Женщины с отягощенным акушерским анамнезом (невынашиваемость, мертворождение и т.п.)
- 3. Беременные женщины с целью выявления риска инфицирования (по контакту краснуха)
- 4. Новорожденные дети с клиническими признаками внутриутробной инфекции (ВУИ)

<sup>\* &</sup>lt;u>Пр. М3 РФ от 12.11.2012 №572н</u> «Порядок оказания мед.помощи по профилю «акушерство и гинекология (за иключением использования вспомогат. репродуктивных технологий)»,

<sup>\* &</sup>lt;u>Пр. МЗ РФ от 30.08.2012 №107н</u>, Распоряжение Комитета по здравоохранению от 26.01.2015 №9-р (о репродуктивных технологиях).

### ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА TORCH-ИНФЕКЦИЙ (СКРИНИНГ)

Скрининг: определение специфических IgG и IgM антител в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА, ИХЛА, ИЭХЛА и др).

<u>Дополнительные методы</u>: иммунный блот (ИБ), полимеразная цепная реакция (ПЦР)

По назначению для диагностики TORCH методы делятся на:

- непрямые (косвенные) серологические определение специфических IgM и IgG в крови.
- прямые методы (обнаружение возбудителя для верификация диагноза) РИФ, ИГЦХ, ПЦР и др.

### ПРИНЦИПЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ TORCH-ИНФЕКЦИЙ (РЕКОМЕНДАЦИИ ВОЗ)

- 1. Одновременное тестирование образца крови на весь комплекс TORCH-инфекций
- 2. Одновременное определение в сыворотке IgG и IgM антител
- 3. Для определения IgG антител использовать количественные методы
- 4. Определение IgM антител проводить по технологии µ-сарture (µ-захвата)
- 5. Использовать тест на авидность IgG антител

- 1. Одновременное тестирование сыворотки на весь комплекс TORCH-инфекций
- 2. Одновременное определение в сыворотке IgG и IgM антител

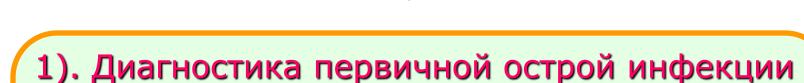


- Сокращение времени обследования
- IgG представление об иммунологическом статусе пациентки на момент беременности (анамнестическая инфицированность)
  - IgM о возможной (текущей) инфекции

3. Применение количественных методов определения IgG антител

- При обследовании в динамике (рост)
- Эффективность постинфекционного и поствакцинального иммунитета (краснуха)
  - Представление о стадии реактивации (для герпетических инфекций, т.к.может не сопровождаться выработкой IgM антител)

4. Определение IgM антител с использованием технологии µ-сарture (IgM-захвата)



2). Снижение частоты ложноположительных результатов

### ПРОБЛЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Основная проблема серологической ИФА диагностики внутриутробных инфекций – <u>специфическое и достоверное</u> определение IgM-антител

### Причины низкой специфичности тестов для определения IgM-антител:

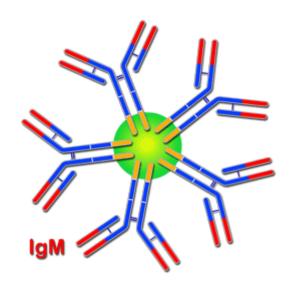
- Низкая авидность IgM по сравнению с IgG- антителами (влияет на силу связывания с антигеном в ИФА)
- Конкуренция за сайты связывания с более аффинными IgG антителами (ложноотрицательные результаты определения IgM)
- Перекрестные реакции в присутствии ревматоидного фактора, гетерофильных антител и др. веществ (ложноположительные результаты определения IgM)

### ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ НИЗКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ТЕСТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IGM-АНТИТЕЛ:

- 1. Антигенспецифические IgG, присутствующие в организме после перенесенной или латентной инфекции, могут конкурировать за антиген со специфическими IgM-антителами, образовавшимися в ответ на новую инфекцию. Такая конкуренция приводит к ложноотрицательным результатам анализа.
- 2. Ревматоидный фактор (РФ) это аутоантитела преимущественно класса IgM (хотя могут присутствовать также антитела класса IgG и IgA), которые могут перекрестно давать ложноположительные результаты.
- 3. Дополнительно, ложноположительные результаты при герпетических инфекциях могут быть получены у пациентов, инфицированных эволюционно родственными вирусами. Так, вирус простого герпеса (HSV ½) и вирус Эпштейна-Барр (EBV) родственны цитомегаловирусу (CMV) и имеют с ним множественные общие антигенные детерминанты.

### ПОВЫШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IGM АНТИТЕЛ

Использование тест-систем с первичным захватом IgM-антител (т.н. µ—захват или IgM-capture). В подобных тест-системах на твердой основе сорбируют не специфический антиген, а анти-µ антитела.



### КЛАССЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

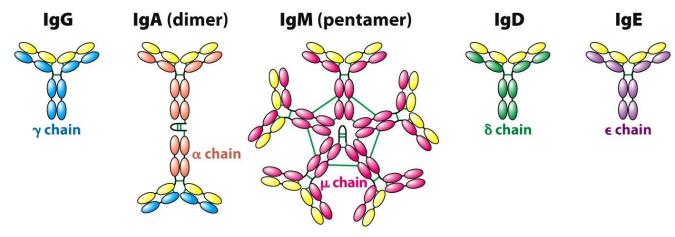
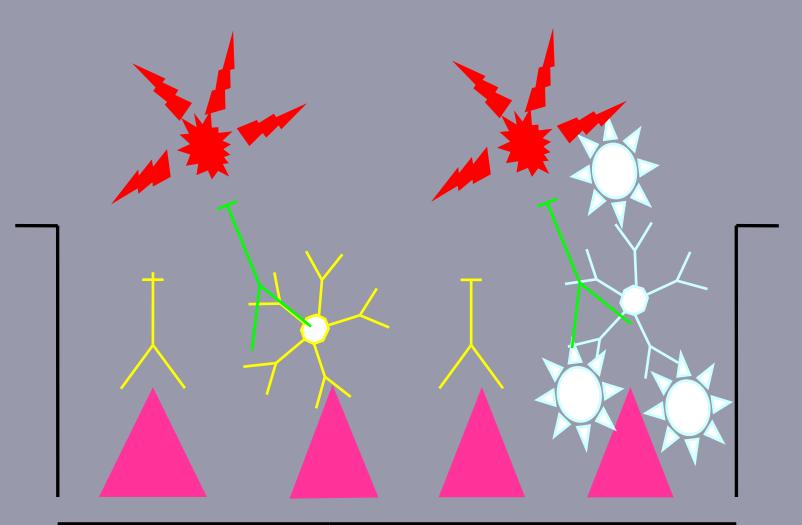


Figure 34.8

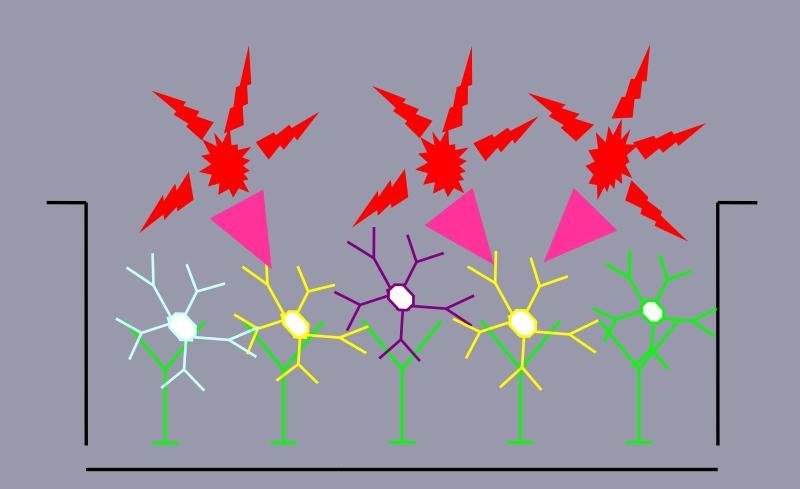
Biochemistry, Seventh Edition

© 2012 W. H. Freeman and Company

# СХЕМА КЛАССИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ИФА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ IGM-АНТИТЕЛ (АНТИГЕН НА ПОДЛОЖКЕ)



## СХЕМА ИФА С ПЕРВИЧНЫМ ЗАХВАТОМ IGM-АНТИТЕЛ (АНТИ-IGM НА ПОДЛОЖКЕ)



### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРИЕМЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ

Для повышения чувствительности и специфичности:

- 1) Многостадийность (2-х и более стадийные наборы обладают большей специфичностью)
- 2) Для усиления сигнала (чувствительности) без потери специфичности используют систему биотина стрептовидина, основанную на высоком родстве этих компонентов: биотин низкомолекулярный растворимый витамин, стрептовидин бактериальный белок.

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

Фирма «Radim» использует систему БС в планшетных наборах CMV IgM: коньгат 1 – Биотин + АГ, коньгат 2-Стрептовидин), что делает их уникальными.

#### НАБОР ЦМВ IGM "RADIM" - КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА IGM

**1.Планшет (МТР) 1х96** 

Антителами против µ-цепей IgM («µ-capture»)

- 2.Коньюгат 1-Биотин: (CONJ/BIO) с АТ против CMV-1x19ml
- 3.Коньюгат 2-СТРЕПТАВИДИН: (CONJ) HRPO -1x14ml
- 4.Положительный контроль:

POS-красного цвета-2ml

- 5. Cut-off контроль: C/O-голубого цвета) 1x2ml,
- 6.Лиофилизат Антиген (Ag)- 7x2,5 ml
- 7.Отрицательный контроль: NEG 1x2ml
- 8. Раствор для разведения сывороток -

DIL x20-1x100ml;

- 9.Промывочный p-p -WASH x20- 1x50ml;
- 10.TM5 -1x14mI;
- 11.Стоп-реагент—STOP- 1x14ml;
- 12. Бумага для заклеивания-СРА
- 13.Пластиковый пакет

Cytomegalovirus «CMV IgM»

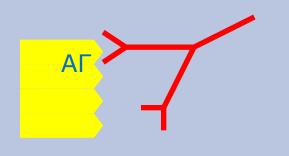


5. Использование теста на авидность IgG антител

Определение вероятных сроков давности инфекции.

### **АВИДНОСТЬ IGG АНТИТЕЛ**

Которого направлены эти антигеном, против которого направлены эти антигела



Низкоавидные антитела – низкая сила связывания Аг-Ат, структура антитела плохо соответствует структуре антигена



Высокоавидные антитела - высокая сила связывания Аг-Ат, структура антитела хорошо соответствует структуре антигена (ключ-замок)

Av=
$$\Sigma(af_1+af_2...+af_n)$$

### Антитела низкой авидности



### Антитела высокой авидности



### ЧЕМ ИЗМЕРЯЕТСЯ АВИДНОСТЬ?

Авидность сыворотки выражается через индекс авидности (ИА)

ИА – отношение силы связывания антител с антигеном в сыворотке, обработанной сильным ионным детергентов, к силе связывания антител с антигеном в нативной сыворотке (выраженное в %%)

$$VA = \frac{O\Pi \text{ обработанной сыворотки}}{O\Pi \text{ нативной сыворотки}} X100\%$$

ИА < 40% - низкая авидность

ИА 40-60% - промежуточная авидность

ИА > 60% - высокая авидность

### **КРАСНУХА**

Распоряжение Комитета по здравоохранению от 27.11.2014 № 845-р «Об организации лабораторной диагностики краснухой в Санкт-Петербурге»:

- 1.1. Кровь больного при подозрении на краснуху (с клиническими признаками, имевшего контакт с краснухой и т.п.) на ул. Оборонную, 35 СПб ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Санкт-Петербурге»
- 1.2. Кровь здоровых беременных женщин, у которых при постановке на учет обнаружены IgM-антитела (+IgG или -IgG) направляется в наше учреждение.

Проводим определение IgM, IgG и авидности IgGантител методом ИФА, постановку иммунного блотинга и ПЦР (при необходимости).

### ТРАКТОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ ОБНАРУЖЕНИЯ IGM НА КРАСНУХУ

Критерии оценки ложноположительных результатов обнаружения IgM антител:

- 1. Высокий индекс авидности IgG антител в первом образце крови
- 2. Отсутствие прироста уровней IgM и IgG антител при тестировании в динамике (10-14 дней).
- 3. Наличие белка Е2 при тестировании крови методом иммунного блотинга (ИБ).

### Вывод: современным требованиям скриниговой диагностики TORCH-инфекций отвечают наборы реагентов, включающие:

- Определение IgM антител с использованием технологии µ-capture (µ-захвата)
- Количественный метод определения IgG антител
- Наличие теста на авидность IgG антител



ТЕЛ. ГКДЦ (ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЙ): 717-70-33

МОБ. ТЕЛ.: 8-921-7557-361 С.С.ВАШУКОВА

### СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ