

Комплексная диагностика ToRCH- инфекций



Копнина Елена Олеговна
«Вектор-Бест-Волга»

ToRCH-синдром

ТЕРМИН ПРЕДЛОЖЕН В 1971 Г. ANDRE J. NAIMIAS (1971)

T	Toxoplasmosis	Токсоплазмоз
O	«Others»- другие	<i>Первоначально - сифилис, затем - вирусные гепатиты В, С, ВИЧ, ветряная оспа, мононуклеоз, энтеровирусы, парвовирус В19 и ряд бактериальных инфекций- листериоз и др.</i>
R	Rubella	Краснуха
C	Cytomegalia	Цитомегаловирусная инфекция
H	Herpes simplex	Инфекция вирусом простого герпеса



ToRCH – инфекции характеризуются следующими особенностями:

- Пожизненная персистенция возбудителя в организме при отсутствии клинических проявлений заболевания
- Широкая распространенность среди всех групп населения
- Отсутствие характерной клинической симптоматики
- **Высокий риск трансплацентарной передачи в случае первичной инфекции во время беременности**
- Обострение латентной инфекции при ослаблении защитных сил организма и снижении напряженности иммунитета (иммунокомпрометированные)
- заболевание клинически трудно распознается и выявляется только с использованием лабораторных методов
- отсутствие стандартов лабораторной диагностики
- сложность интерпретации полученных результатов



Частота клинических проявлений первичного инфицирования

- **Токсоплазмоз - 2 – 5%**
 - **Краснуха - 40 – 60%**
 - **Цитомегалия - менее 40%**
 - **Герпес - менее 40%**
- (для иммунокомпетентных лиц)**

Группы лиц, подлежащие обследованию*

- Женщины, планирующие беременность (здоровые)
- Женщины с отягощенным акушерским анамнезом (невынашиваемость, мертворождение и т.п.)
- Беременные женщины с целью выявления риска инфицирования (по контакту - краснуха)
- Новорожденные при внутриутробном инфицировании
- ВИЧ-инфицированные

- *Пр. МЗ РФ от 12.11.2012 №572н «Порядок оказания мед.помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогат. репродуктивных технологий)»,*
- ** Пр. МЗ РФ от 30.08.2012 №107н, Распоряжение Комитета по здравоохранению от 26.01.2015 №9-р (о репродуктивных технологиях).*



Маркеры инфекций

- Специфические иммуноглобулины класса М (**IgM**)
- Специфические иммуноглобулины класса А (**IgA**)
- Специфические иммуноглобулины класса G (**IgG**)
- Индекс авидности специфических иммуноглобулинов класса G (**ИА IgG, %**)
- **Возбудитель** инфекции, его **белки** или нуклеиновая кислота (**НК**)

Цель лабораторной диагностики

Выявление:

- **наличие или отсутствие инфекции**
- **первичной инфекции:** сероконверсия, выявление *IgM*, *IgA*, низкоавидных *IgG*
- **латентной (паст-) инфекции:** выявление *IgG*, отсутствие *IgM* (*IgA*), определение высокоавидных *IgG*
- **реактивации латентной инфекции:** увеличение концентрации *IgG* в парных образцах сыворотки крови, выявление *IgM*, наличие высокоавидных *IgG*
 - определение группы риска: (серонегативных)
 - определение специфических *IgG*

Принципы взаимодействия АГ-АТ

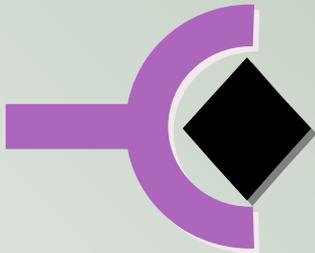


- Концепция «ключ-замок» (пространственное соответствие).
- Нековалентное взаимодействие (водородные связи, электростатические, гидрофобные, силы Ван-дер-Ваальса).
- Обратимость взаимодействия.

* *Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S.J., Mariuzza, R.A., Biochemistry 39, 6296, 2000*

Рецептор-лиганд (антитело-антиген)

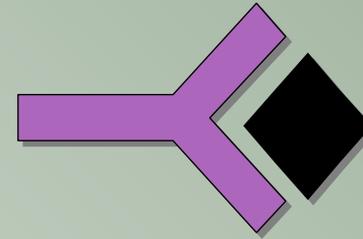
**Низкоаффинные
Антитела**



Связь непрочная

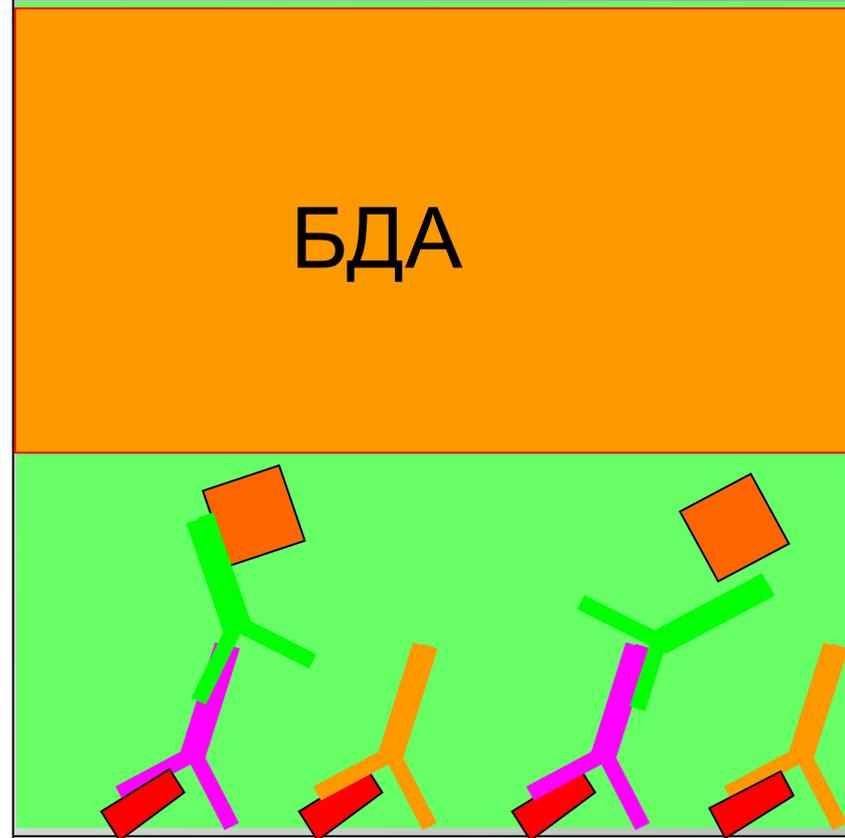
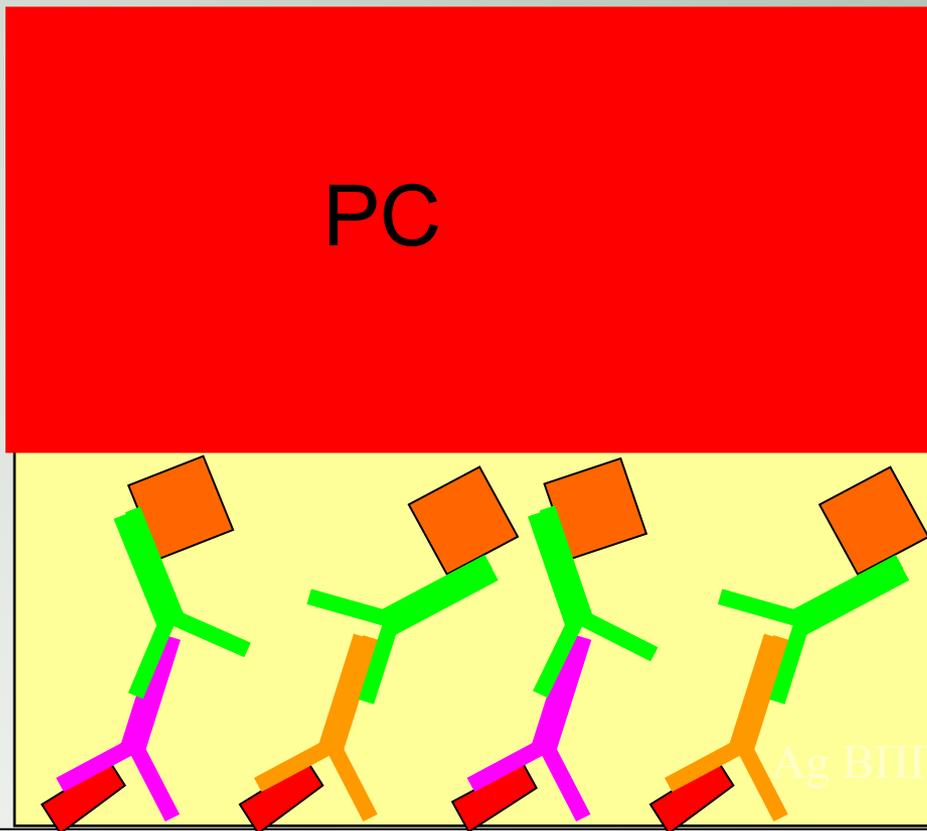


**Высокоаффинные
Антитела**

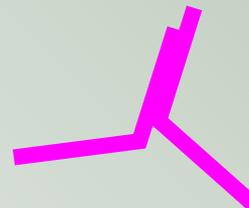


Связь прочная

- Аффинность – понятие, отражающее прочность соединения в реакции между эпитопом антигена и паратопом антител. Аффинность характеризуется константой ассоциации (лиганд-рецептор, иммунный домен антигена-антитело).
- Авидность – сумма аффинностей связывания доменов антигена с поликлональными антителами.



Низкоавидные IgG



Высокоавидные IgG

**Схема ИФА для определения индекса
авидности специфических IgG**

Необходимость дополнительного теста на авидность для беременных женщин

- Возможность наличия IgM при реактивации и реинфекции.
- Возможная длительная персистенция IgM после сероконверсии.
- Возможное отсутствие IgM при острой первичной инфекции.
- Поздние сроки проведения анализа.
- Снятие ложнопозитивных результатов при определении IgM.

Ограничения теста

Объективные

- Нетипичные сроки созревания антител вследствие иммуносупрессии, возрастных изменений.
- Генетическая изменчивость возбудителей инфекций.
- Наличие гомологичных белков у родственных возбудителей инфекций.
- Использование в лечении препаратов крови (иммуноглобулины внутривенно).
- Интерферонотерапия.

Субъективные

- Дизайн теста.
- Концентрация антител.

Герпесвирусная инфекция



Краткая характеристика видов вируса герпеса

№	Общепринятая аббревиатура	Название	Основные заболевания
1.	ВПГ-1	Вирус простого герпеса 1 типа	Орофациальный герпес
2.	ВПГ-2	Вирус простого герпеса 2 типа	Генитальный герпес
3.	VZV	Вирус <i>Varicella-Zoster</i>	Ветряная оспа
			Опоясывающий лишай
4.	ВЭБ	Вирус Эпштейна-Барр	Инфекционный мононуклеоз, лимфома Беркитта, нозофаренгиальная карцинома, ворсистая лейкоплакия языка
5.	ЦМВ	Цитомегаловирус	Врожденные аномалии
6.	HHV-6	Герпес-вирус 6 типа	Экзантема у детей раннего возраста, синдром хронической усталости у взрослых
7.	HHV-7	Герпес-вирус 7 типа	Лимфопролиферативные заболевания
8.	HHV-8	Герпес-вирус 8 типа	Саркома Капоши



Вирус простого герпеса

ВПГ-1

**Орофациальный
герпес**

**60-100% взрослого
населения**

ВПГ-2

**Генитальный
герпес**

**10-40% взрослого
населения**

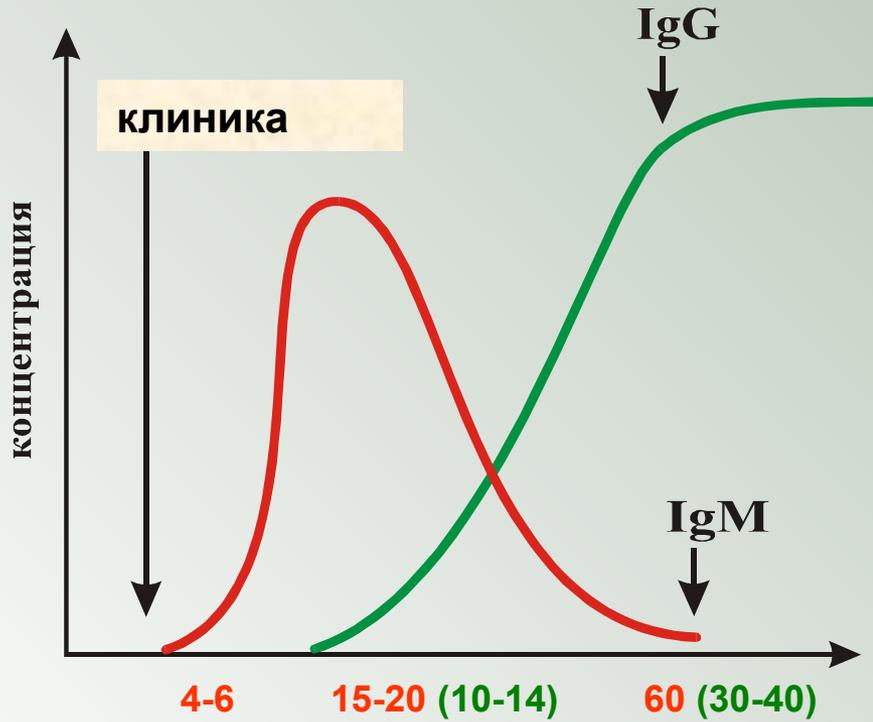


Актуальность лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций

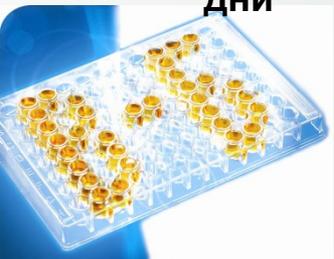
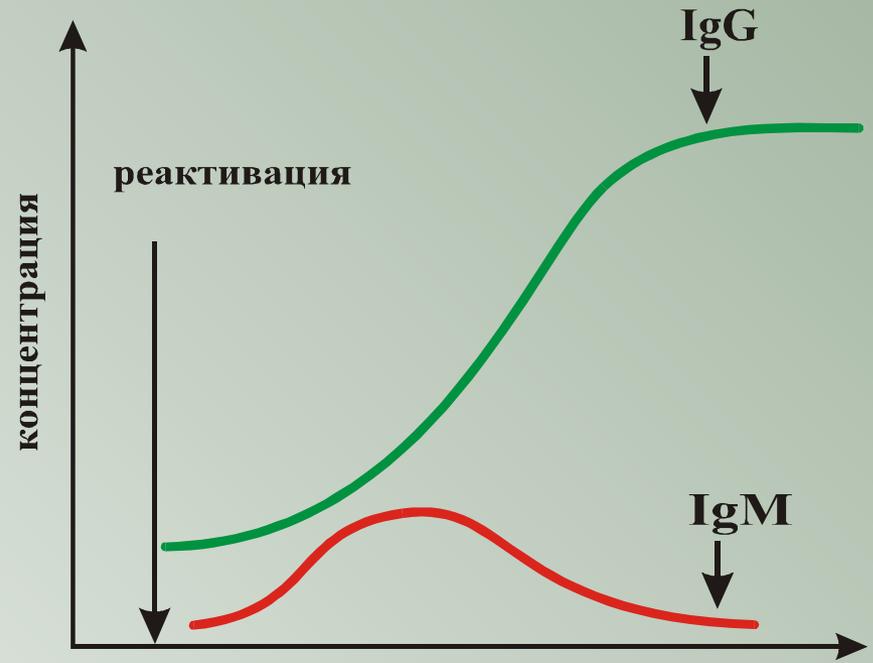
- оппортунистический и СПИД-маркерный характер заболеваний;
- дифференциальный диагноз с заболеваниями другой этиологии;
- дифференциальная диагностика внутри семейства герпес вирусов;
- риск инфицирования плода во время беременности с развитием нарушений органо- и гистогенеза;
- **этиологическая роль герпес вирусов в канцерогенезе.**



**ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПРИ
ТИПИЧНОМ РАЗВИТИИ ПЕРВИЧНОЙ
ИНФЕКЦИИ**



**ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ АНТИТЕЛ К
ВИРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПРИ
РЕАКТИВАЦИИ (РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ
ГЕРПЕСЕ)**



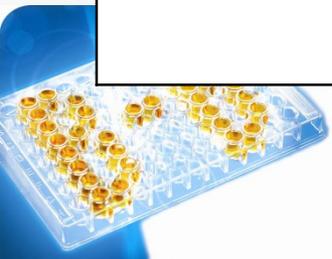
**Специфические IgM к ВПГ не являются
надежным и достоверным
доказательством первичной герпетической
инфекции**

- Могут образовываться как при первичном инфицировании, так и при реинфекции и реактивации



Интерпретация результатов определения ИА IgG к ВПГ

ИА (%)	Сроки инфицирования
< 50%	до 3 месяцев
50-70%	3-5 месяцев
>70%	> 5 месяцев



Результаты определения IgG к ВПГ-2 у представителей различных групп

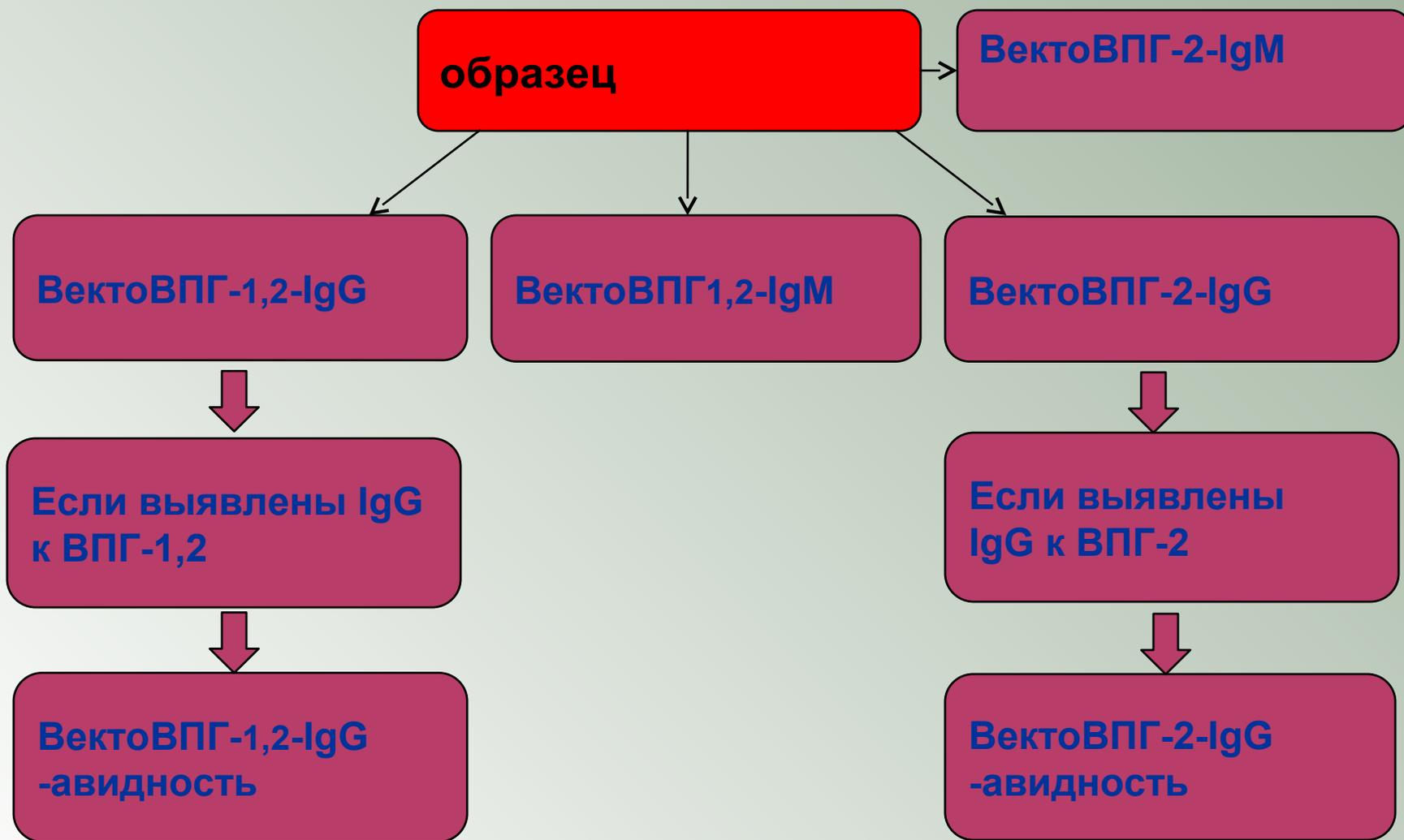
Группы	Общее количество образцов	Серопозитивные по ВПГ-2	
		количество	%
Дети от 1,5 до 13 лет	661	16	2,4
Здоровые доноры крови	631	146	23
Доноры, забракованные по маркерам гепатита В, С, сифилиса или ВИЧ-инфекции	218	59	27
Онкологические больные	70	21	30
Больные с диагнозом РГГ*	114	84	73,6
Больные с диагнозом РГЛ*	31	7	23
Больные с подозрением на ГГ**	56	10	18
Женщины, занимающиеся коммерческим сексом	10	5	50

*РГГ – рецидивирующий генитальный герпес

**РГЛ – рецидивирующий лабиальный герпес

***ГГ – генитальный герпес

Алгоритм исследований



Определение формы ГИ по результатам ИФА

Серологические маркеры	Пациент не инфицирован ВПГ	Первичная инфекция	Первый клинический эпизод непервичной инфекции	Рецидивирующая инфекция	Латентная инфекция
IgM	-	+/-	-/+	-/+	-
IgG	-	-/+ сероконверсия	+	+	+
Авидность IgG	-	Низкоавидные	Высокоавидные	Высокоавидные	Высокоавидные
Титр IgG	-	Наращение титра (не менее 4-х кратного)	Наращение титра может и не быть	Наращение титра может и не быть	Титр стабилен

Диагностика вируса герпеса 1,2 типов



ВектоВПГ-IgG	Определение IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов
ВектоВПГ1,2-IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов
ВектоВПГ-IgM	Определение IgM к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов
ВектоВПГ 2-IgG	Определение IgG к вирусу простого герпеса 2 типа
ВектоВПГ 2-IgM	Определение IgM к вирусу простого герпеса 2 типа
ВектоВПГ-2-IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к вирусу простого герпеса 2 типа
РеалБест ДНК ВПГ-1,2	Набор реагентов для одновременного выявления ДНК ВПГ 1 и 2 типов методом ПЦР в режиме реального времени
РеалБест ДНК ВПГ-1/ВПГ-2	Набор реагентов для одновременного выявления ДНК и дифференциации ВПГ 1 и 2 типов методом ПЦР в режиме реального времени



Диагностика цитомегаловирусной инфекции

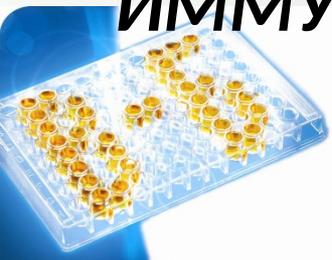


Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ)

(от cytos клетка + megas большой + вирус)

Вызывается **ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ** (вирус герпеса 5 типа)

ЦМВИ - повсеместно распространенная инфекция с широким спектром клинико-патогенетических проявлений, в основе которых лежат различные варианты **ИММУНОСУПРЕССИИ**.

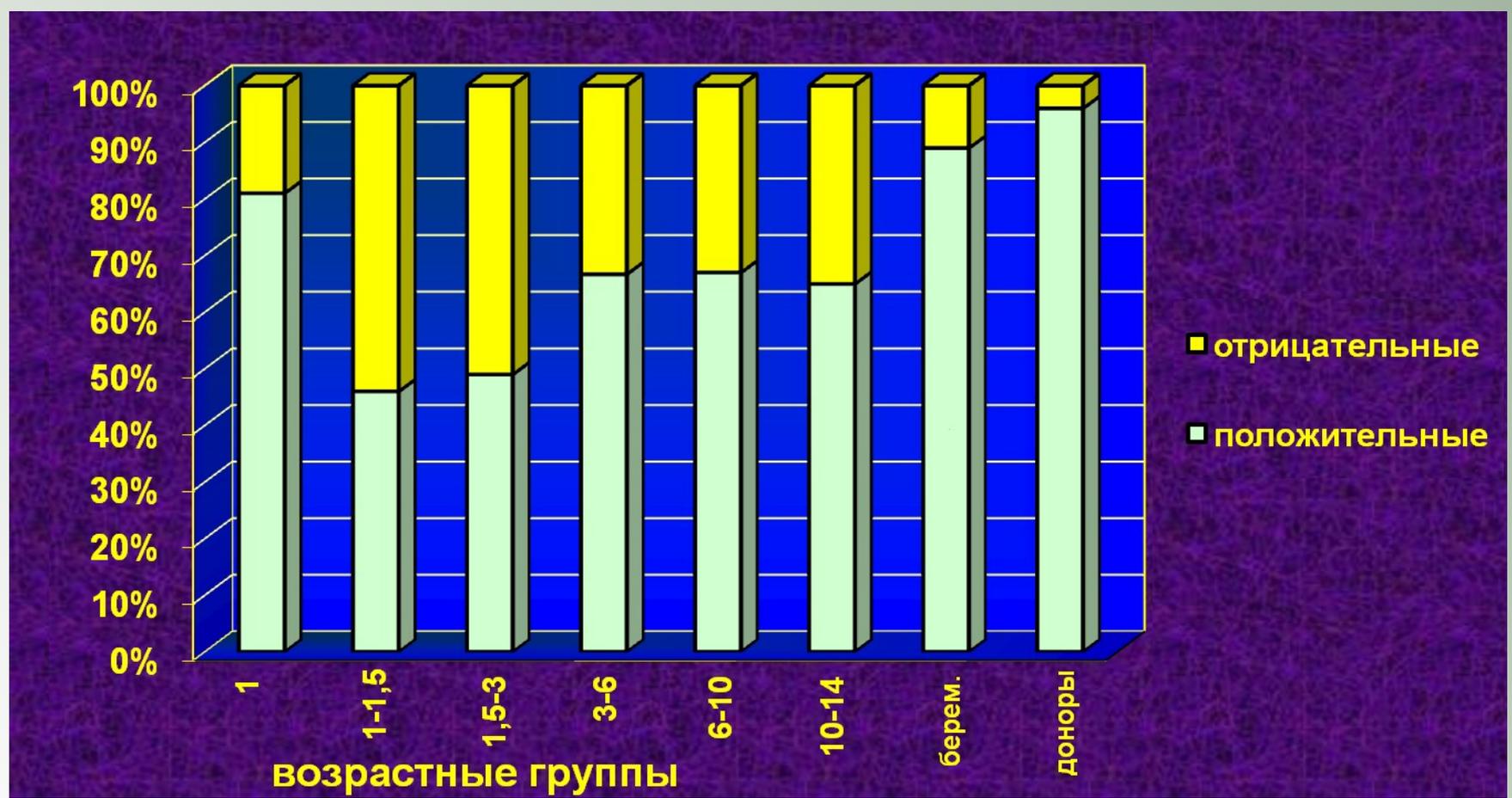


Группы риска ЦМВИ

- беременные
- дети недоношенные, новорожденные и раннего возраста
- реципиенты крови и органов
- онкологические больные
- гематологические больные
- больные СПИД и ВИЧ инфицированные
- пациенты с иммунодефицитами различной этиологии
- гомосексуалисты
- медицинские работники



Распространенность ЦМВ среди разных возрастных групп



Серологические маркеры ЦМВИ

- **IgM к предранним белкам**
- **IgG к предранним белкам**
- **IgM к структурным белкам**
- **IgG к структурным белкам**
- **Индекс авидности IgG**

Предранние IgM, IgG – маркеры острой фазы, указывают на наличие репликативного процесса, происходит репликация и сборка вирусных частиц в инфицированных клетках при первичной инфекции, реактивации, реинфекции.

Индекс авидности IgG указывает только на сроки инфицирования и не связан с клиникой и остротой процесса.

Выявление иммуноглобулинов класса G и M к предраннему белку цитомегаловируса, по отдельности или обоим вместе (IgG и/или IgM), может быть использовано для диагностики острой стадии первичной или рецидивирующей цитомегаловирусной инфекции.

Варианты интерпретации результатов анализа антител к ЦМВ

	Предранние IgM	IgM	Предранние IgG	IgG	Индекс авидности IgG	Интерпретация
1	Отриц.	Отриц.	Отриц.	Отриц.	-	1. Пациент серонегативен, инфицирования нет 2. Начальная стадия первичной инфекции до появления иммунного ответа 3. Возможна сильная иммуносупрессия. При наличии клинических проявлений необходимо подтверждение ЦМВИ выявлением вируса или его ДНК.
2	Полож.	Отриц.	Отриц.	Отриц.	-	Начальная стадия первичной инфекции. Повторное определение IgG и IgM через 1-2 недели
	Полож.	Полож.	Отриц.	Отриц.	-	
	Полож.	Полож.	Полож.	Отриц.	-	
	Отриц.	Полож.	Отриц.	Отриц.	-	
	Отриц.	Полож.	Полож.	Отриц.	-	
	Полож.	Отриц.	Полож.	Отриц.	-	
	Отриц.	Отриц.	Полож.	Отриц.	-	

НА – низкоавидные IgG; ВА – высокоавидные IgG.

Предранние IgM и предранние IgG – маркеры острой фазы, указывают на наличие репликативного (т.н. «абортивного») процесса, происходит репликация и сборка вирусных частиц в инфицированных клетках при первичной инфекции, реактивации, реинфекции.

Индекс авидности IgG указывает только на сроки инфицирования и не связан с клиникой и остротой процесса.

Варианты интерпретации результатов анализа антител к ЦМВ

	Предранние IgM	IgM	Предранние IgG	IgG	Индекс авидности IgG	Интерпретация
3	Полож.	Полож.	Полож.	Полож.	НА	Развитие недавнего первичного инфицирования
	Отриц.	Полож.	Полож.	Полож.	НА	
	Отриц.	Полож.	Отриц.	Полож.	НА	
	Полож.	Отриц.	Полож.	Полож.	НА	
	Полож.	Полож.	Отриц.	Полож.	НА	
	Отриц.	Отриц.	Полож.	Полож.	НА	
	Полож.	Отриц.	Отриц.	Полож.	НА	
4	Полож.	Полож.	Полож.	Полож.	ВА	Реактивация латентной инфекции или реинфекция
	Отриц.	Полож.	Полож.	Полож.	ВА	
	Отриц.	Полож.	Отриц.	Полож.	ВА	
	Полож.	Отриц.	Полож.	Полож.	ВА	
	Полож.	Полож.	Отриц.	Полож.	ВА	
	Отриц.	Отриц.	Полож.	Полож.	ВА	
	Полож.	Отриц.	Отриц.	Полож.	ВА	
5	Отриц.	Отриц.	Отриц.	Полож.	ВА	Латентная инфекция. Возможна хроническая вялотекущая инфекция.

НА – низкоавидные IgG; ВА – высокоавидные IgG.

Предранние IgM, IgM и предранние IgG – маркеры острой фазы, указывают на наличие репликативного (т.н. «абортивного») процесса, происходит репликация и сборка вирусных частиц в инфицированных клетках при первичной инфекции, реактивации, реинфекции.

Индекс авидности IgG указывает только на сроки инфицирования и не связан с клиникой и остротой процесса.

**Интерпретация результатов разбивается на
5 блоков в зависимости от комбинации получаемых результатов:**

- 1 - все маркеры отрицательны;**
- 2 - IgG отрицательные, все комбинации маркеров острой фазы – начальная стадия первичной инфекции;**
- 3 - IgG положительные и низкоavidные, все комбинации маркеров острой фазы – развитие недавнего первичного инфицирования;**
- 4 - IgG положительные и высокоavidные, все комбинации маркеров острой фазы – реактивация, реинфекция;**
- 5 - IgG положительные и высокоavidные, маркеры острой фазы отрицательны – латентная инфекция (возможна хроническая вялотекущая инфекция).**

Все эти варианты, приведенные в таблице, реализуются в жизни, о чем свидетельствуют данные исследования сывороток крови пациентов разного возраста с различными заболеваниями (ЦМВИ также является оппортунистической инфекцией, и часто присоединяется к текущим заболеваниям различного генеза). *(Не реализовалась лишь ситуация с одновременным присутствием всех маркеров острой фазы с наличием низкоavidных IgG.)*

Алгоритм обследования беременных методом ИФА

Обследование методом ИФА всех беременных при их первом обращении в женскую консультацию

Антитела не обнаружены

Группа риска

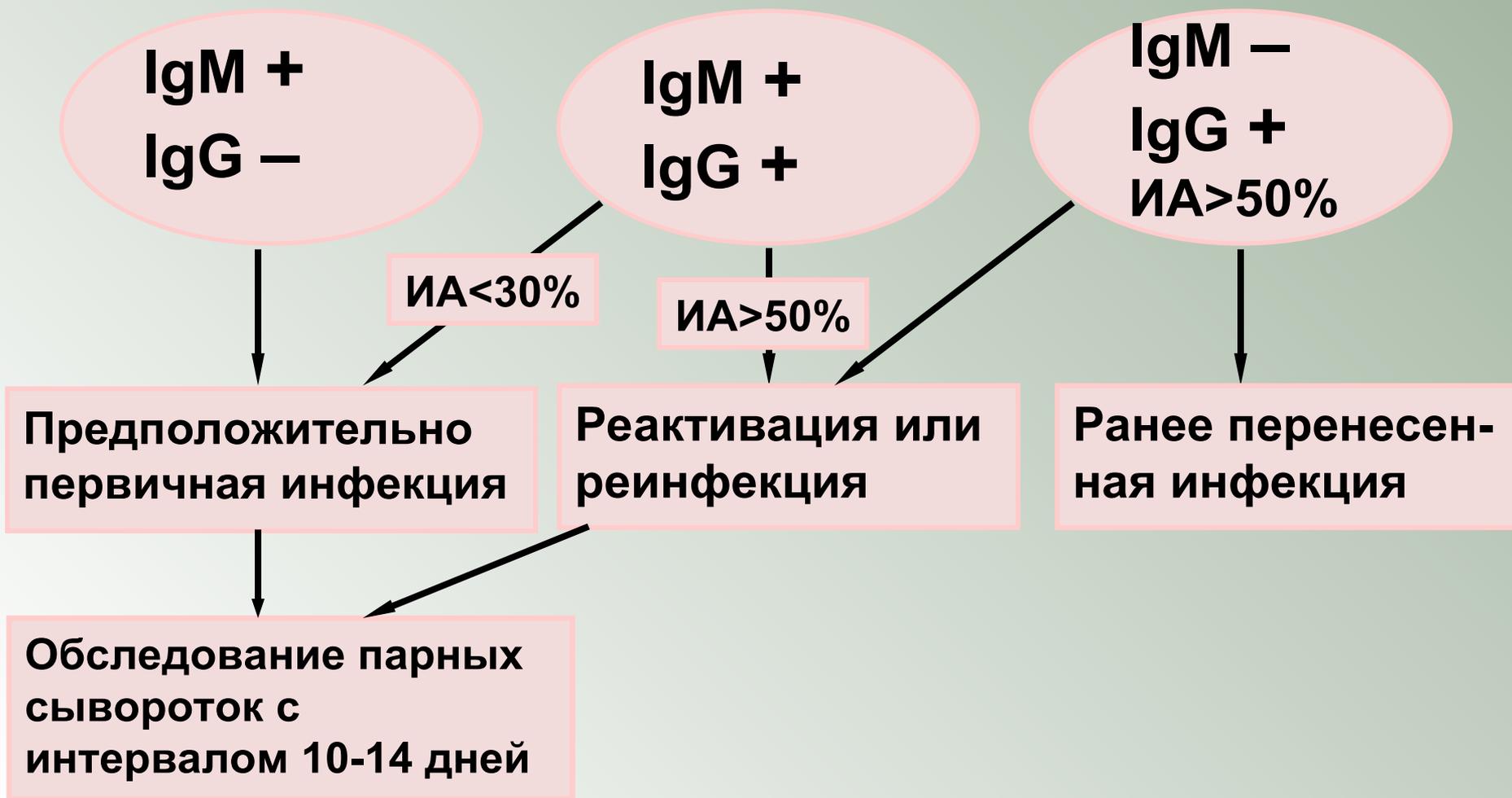
Антитела обнаружены

IgM+
IgG -

IgM+
IgG+

IgM-
IgG+

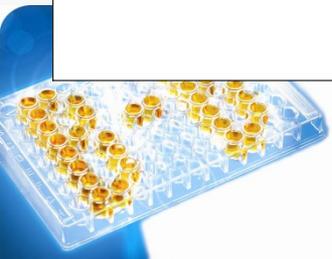
Интерпретация полученных результатов серологического обследования беременных женщин





Диагностика ЦМВ

ВектоЦМВ - IgM	Определение IgM к ЦМВ
ВектоЦМВ-IgG-	Определение IgG к ЦМВ
ЦМВ-IgG-ИФА-БЕСТ	Качественное и количественное определение IgG к ЦМВ
ВектоЦМВ-IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к ЦМВ
ВектоЦМВ-IEA-антитела	Определение IgM и IgG к предраннему белку ЦМВ
ЦМВ-IgG-блот-БЕСТ	Набор реагентов для подтверждения наличия иммуноглобулинов Gк цитомегаловирусу в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноблотинга
РеалБест ДНК ЦМВ	Набор реагентов для выявления ДНК ЦМВ методом ПЦР в режиме реального времени
РеалБест ДНК ЦМВ/ВПГ 1,2	Набор реагентов для выявления в одной пробе ДНК ЦМВ и ДНК ВПГ 1 и 2 типов методом ПЦР в режиме реального времени



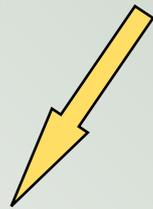
Диагностика инфекций, вызываемых *Varicella Zoster*



ВИРУС ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА – 3

VARICELLA ZOSTER

вызывает



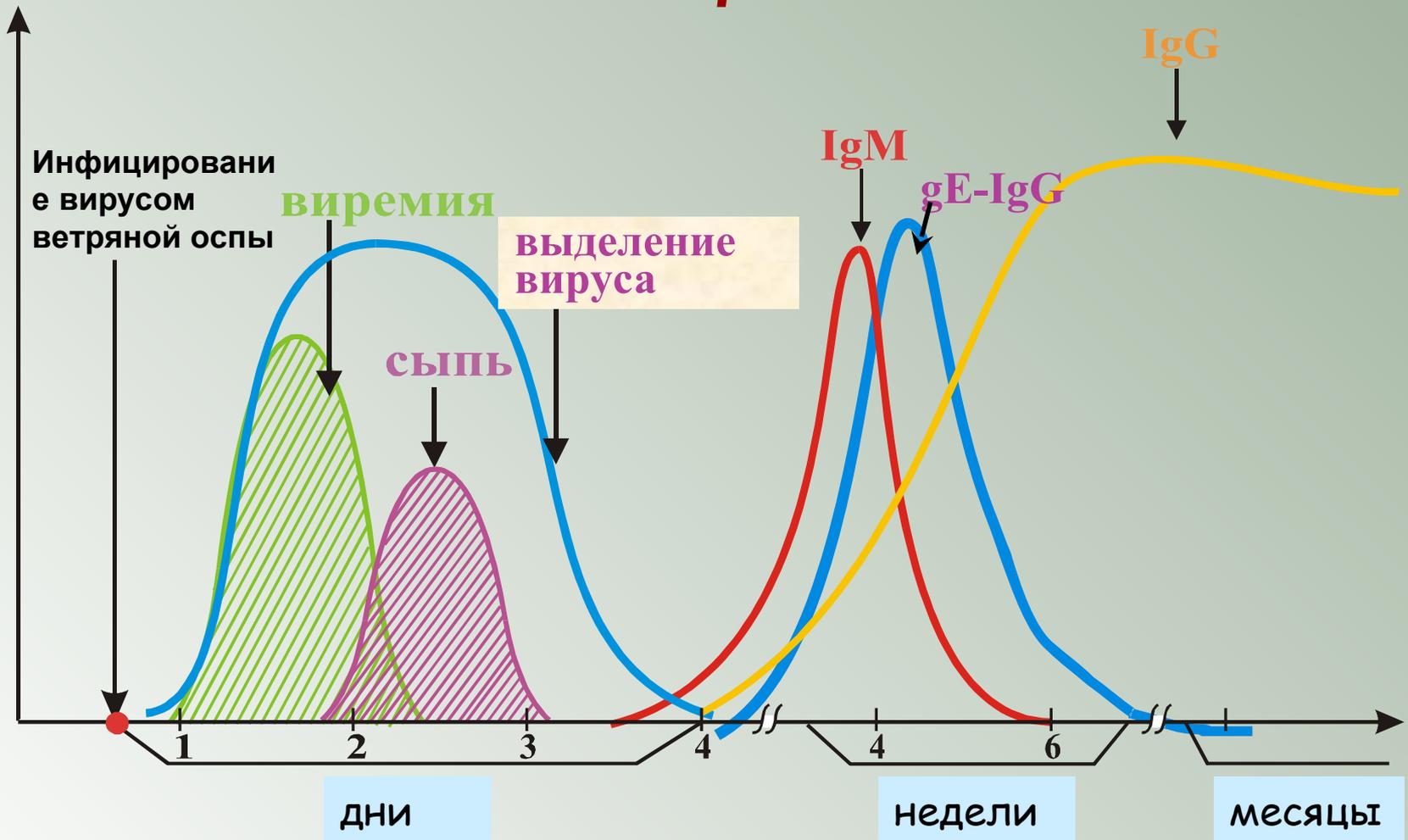
ветрянную оспу



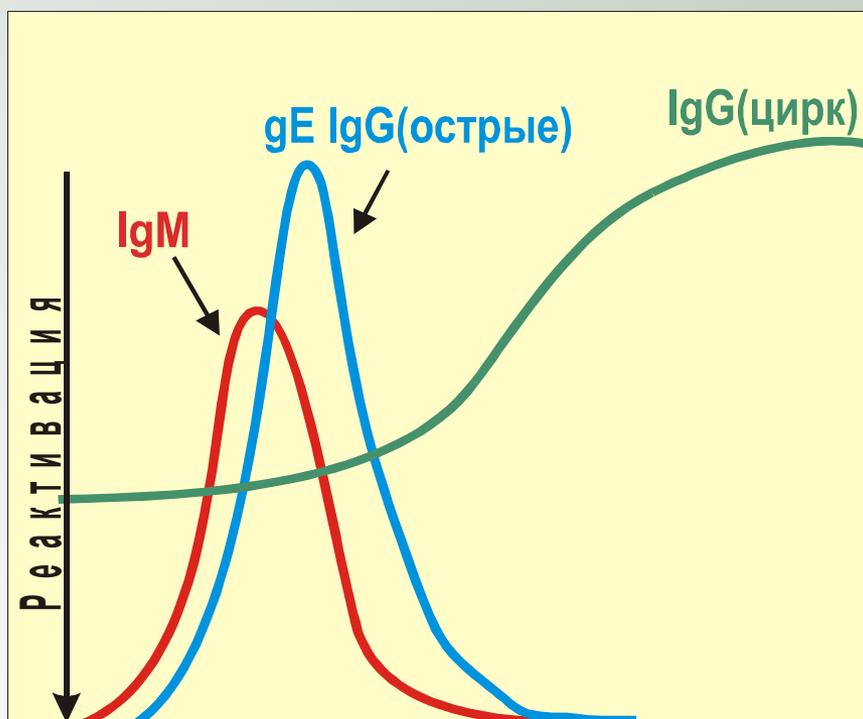
**опоясывающий
лишай**



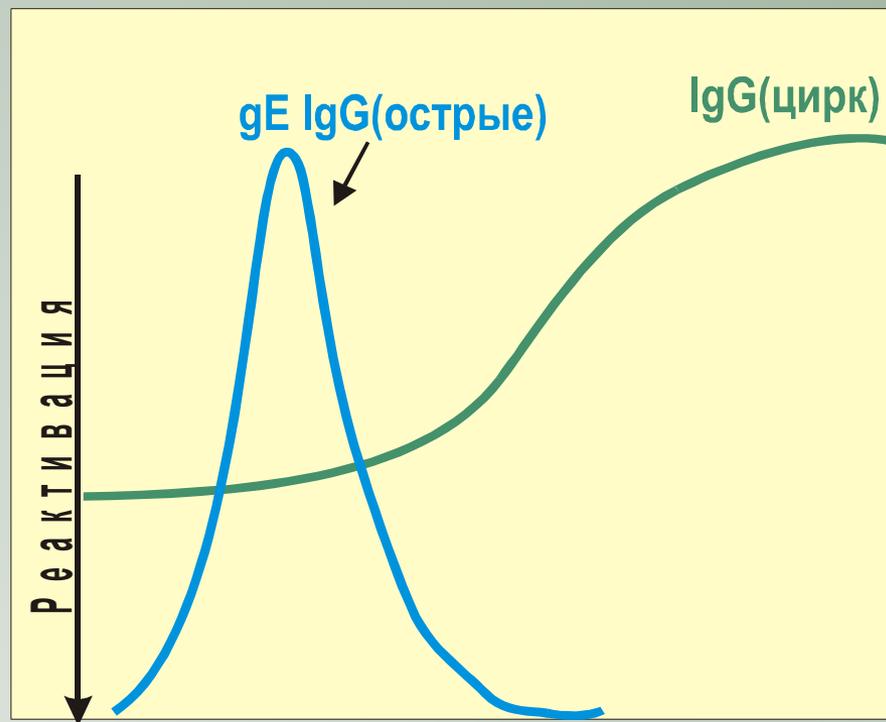
Схематическая диаграмма первичного течения ветряной оспы



Схематическая диаграмма динамики маркеров VZV (опоясывающего лишая)



50-70%



Интерпретация результатов определения маркеров инфекции VZV

Стадия заболевания	Маркеры острой стадии		Пастинфекция
	IgM	gE-IgG(остр.)	IgG(циркул.)
Инкубационный период или отсутствие инфекции	—	—	—
Очень ранняя первичная инфекция	+	—	—
Ранняя первичная инфекция	+	+	+
Поздняя первичная инфекция	—	+	+
Реактивация	+	+	↑+
	—	+	↑+
Паст-инфекция	—	—	+

Диагностика *Varicella Zoster*



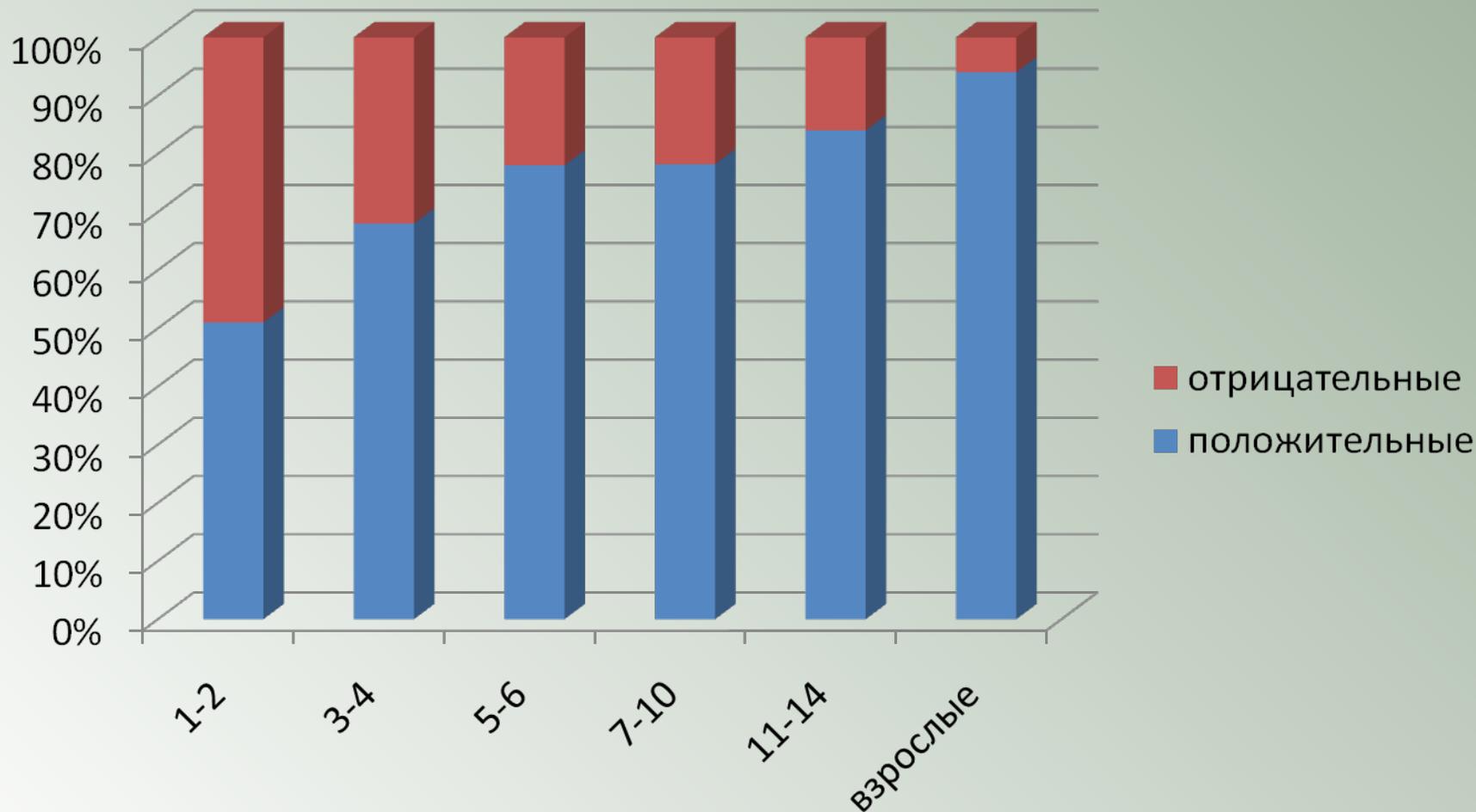
ВектоVZV-gE-IgG	Определение IgG к гликопротеину E вируса Варицелла-Зостер
ВектоVZV-IgM	Определение IgM к вирусу Варицелла-Зостер
ВектоVZV-IgG	Определение IgG к вирусу Варицелла-Зостер



**Диагностика инфекции,
вызываемой вирусом Эпштейна-
Барр**



Распространенность ВЭБ среди различных возрастных групп



Ассоциация инфекции ВЭБ с различными заболеваниями

Заболевание	% ВЭБ-ассоциированности
Инфекционный мононуклеоз	100%
Волосатая лейкоплакия полости рта	100%
Лимфома Ходжкина	
• Смешанно-клеточная/лимфоцит-дефицитная	50-90%
• СПИД-ассоциированная	>95%
Неходжкинские лимфомы и другие опухоли, связанные с иммунодефицитом	
• Неходжкинская лимфома, СПИД-ассоциированная	40%
• Лимфома мозга, СПИД-ассоциированная	95%
• Пост-трансплантационные лимфопролиферации	95%
• Лимфома Беркитта, Африканская	>95%
• Лимфома Беркитта, Северо-американская	20%
• Лимфома Беркитта, СПИД-ассоциированная	30%
• Назальная Т/НК-клеточная лимфома	>95%
Рак	
• Рак желудка	6-16%
• Лимфоэпителиома	>90%
• Рак груди	0-51%
• Назофарингеальная карцинома	100%

Антигены ВЭБ

- Ранний антиген – EA (early antigen)
- Капсидный антиген – VCA (virus capsid antigen)
- Нуклеарный или ядерный антиген – NA (nuclear antigen)



Маркеры инфекции ВЭБ

Маркеры
острой стадии:

IgG к EA

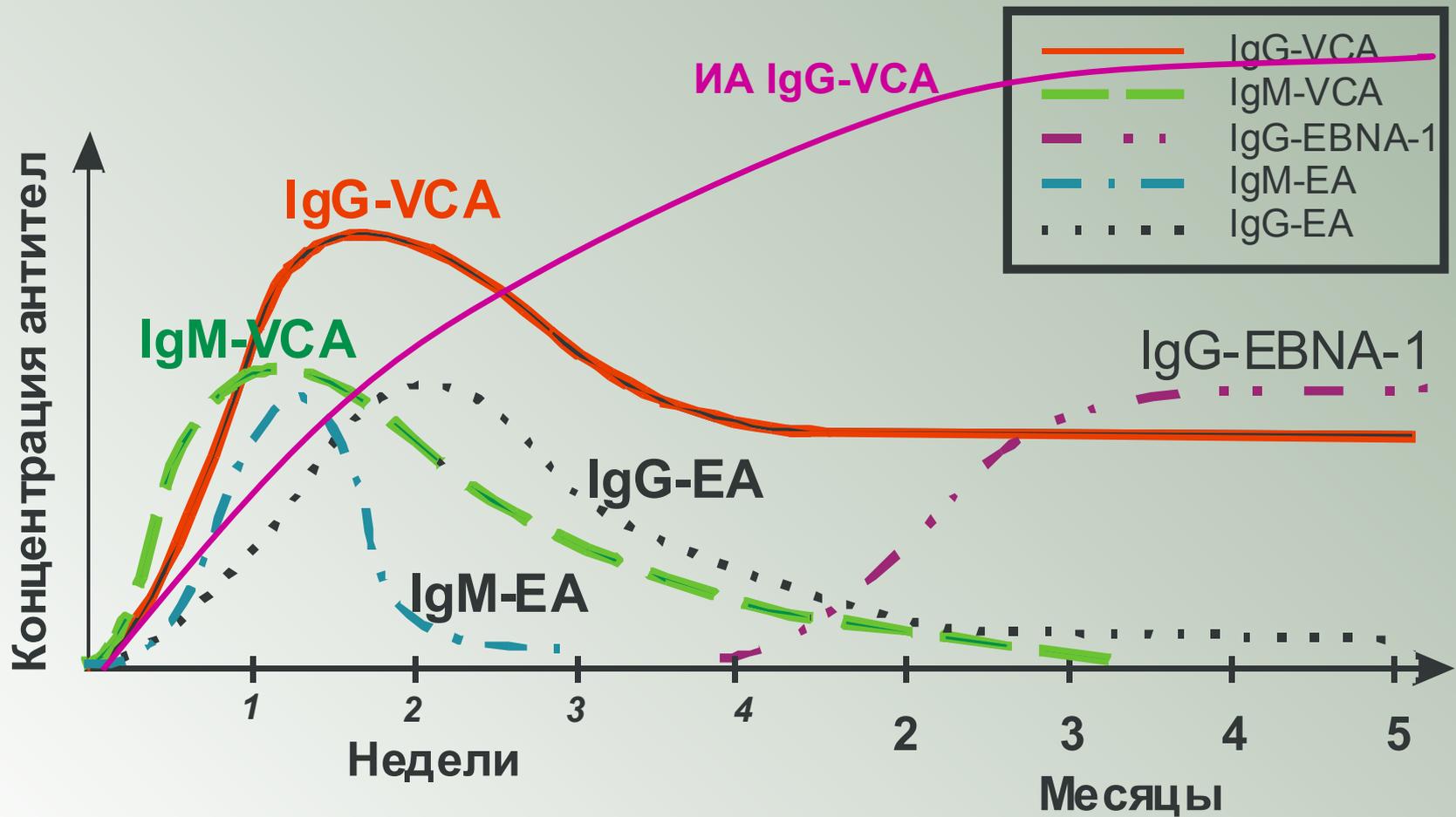
IgM к VCA

Маркеры
паст-инфекции:

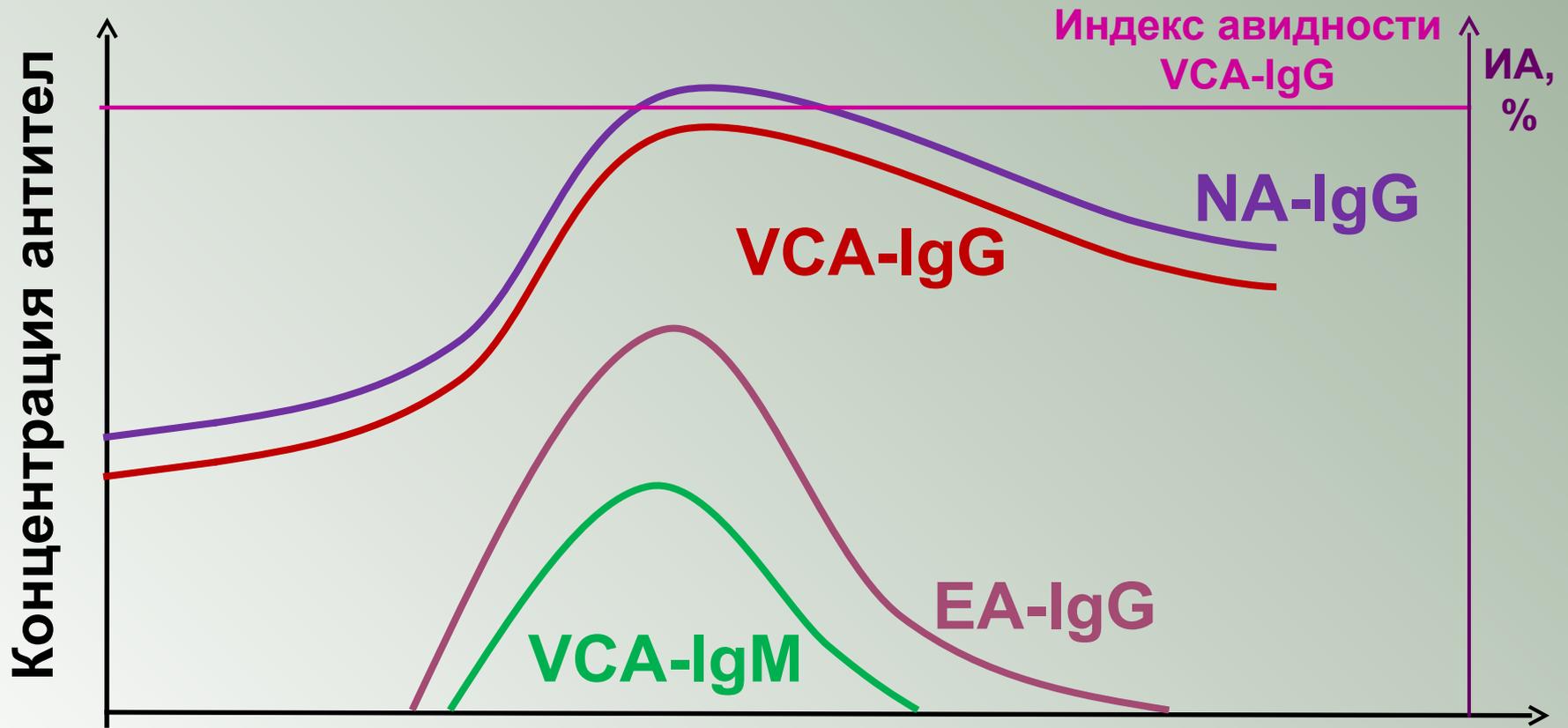
IgG к EBNA



Динамика продукции антител к ВЭБ



Реактивация



Нетипичные случаи серологической картины заболевания:

- позднее появление или отсутствие **анти-EBNA1-IgG** при **паст-инфекции** вследствие иммуносупрессии,
- очень раннее появление **анти-EBNA1-IgG** в фазу **острой первичной инфекции**,
- отсутствие или низкий уровень концентрации **анти-VCA-IgM** при **острой первичной инфекции**,
- длительная персистенция **анти-VCA-IgM** или их повторное появление при **реактивации инфекции**.

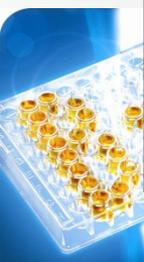
Интерпретация результатов определения маркеров инфекции ВЭБ

Стадия заболевания при первичной инфекции	Маркеры острой стадии		Пастинфекция
	VCA IgM	EA IgG	EBNA IgG
Инкубационный период или отсутствие инфекции	—	—	—
Очень ранняя первичная инфекция	+	—	—
Ранняя первичная инфекция	+	+	—
Поздняя первичная инфекция	±	+	+
Атипичная первичная инфекция	—	+	+



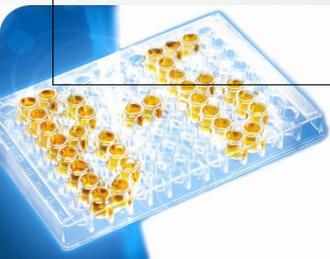
Интерпретация результатов определения маркеров инфекции ВЭБ

Стадия заболевания при хронической инфекции	Маркеры острой стадии		Пастинфекция
	VCA IgM	EA IgG	EBNA IgG
Хроническая инфекция	±	+	—
Ранняя паст- инфекция	—	+	+
Поздняя паст- инфекция (латентная инфекция у клинически здоровых лиц)	—	—	+
Реактивация	+	+	+
Атипичная реактивация	—	+	+



Диагностика вируса Эпштейна-Барр

ВектоВЭБ-VCA-IgG	Выявление IgG к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр
ВектоВЭБ-VCA-IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр
ВектоВЭБ-VCA-IgM	Выявление IgM к капсидному антигену VCA вируса Эпштейна-Барр
ВектоВЭБ-EA-IgG	Определение IgG к раннему антигену EA вируса Эпштейна-Барр
ВектоВЭБ-NA-IgG	Определение IgG к ядерному антигену (NA) вируса Эпштейна-Барр
РеалБест ДНК ВЭБ	Набор реагентов для выявления ДНК ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени



**Диагностика инфекции,
вызываемой вирусом герпеса 6-
типа**



Внезапная экзантема

- Заболевание детей в возрасте от 3-х месяцев до 3 лет
- Первичное инфицирование HHV-6 – наиболее частая причина первой в жизни лихорадки новорожденных
- **Клинические проявления**
 - Инкубационный период 3-17 дней
 - Острое начало с развернутой картиной интоксикации
 - На 4-5 день – появление сыпи в виде бледно-розовых пятен по всему телу
 - Через 2-5 дней наступает выздоровление
 - Исход благоприятный, но бывают осложнения респираторного, гастроинтестинального и неврологического характера



Пути передачи HHV-6

- **Воздушно-капельный**
- **Контактно-бытовой**
- **Половой**
- **Трасфузионный**
- **Вертикальная передача от инфицированной матери плоду как во время беременности, так и после родов (через слюну)**



Динамика образования антител

- **IgM к HHV-6 появляются на 4-5 день после проявления лихорадки и обнаруживаются в течение 2-3 недель**
- **IgG к HHV-6 появляются на 6-7 день, достигают максимальной концентрации через 2-3 недели, далее циркулируют в организме длительное время**
- **Антитела к HHV-6 обнаруживаются у 40-100% населения в зависимости от возраста, места проживания, социально-экологических условий**



**Диагностика инфекции,
вызываемой вирусом герпеса 8-
типа**



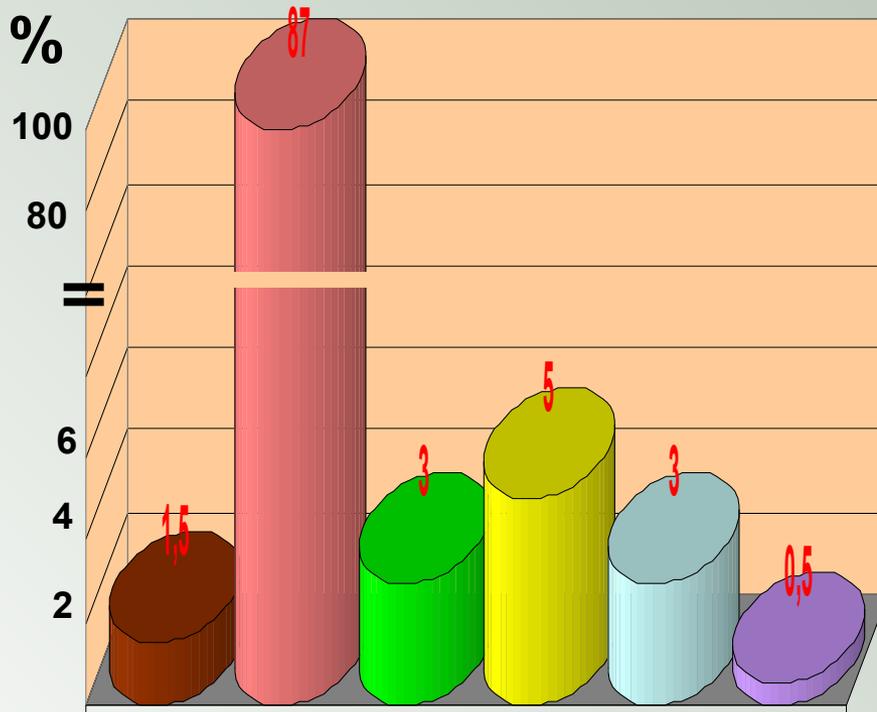
HHV-8

**Саркома
Капоши**

**Неходжкинская
лимфома**

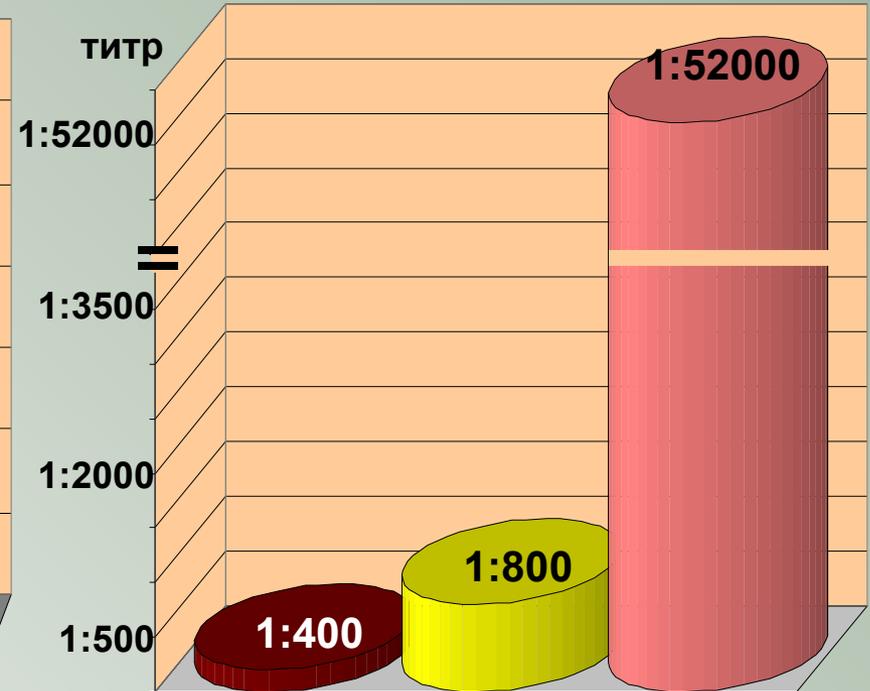


Серодиагностика HHV-8 у различных групп населения г. Новосибирска

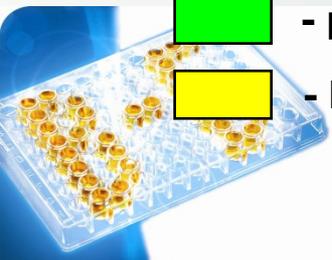


- доноры
- раковые больные
- ВИЧ-инфицированные

Титр IgG к HHV-8 у больных саркомой Капоши (СК)



- пациенты КВД
- дети (3-14 лет)
- больные СК (ВИЧ-инф.)



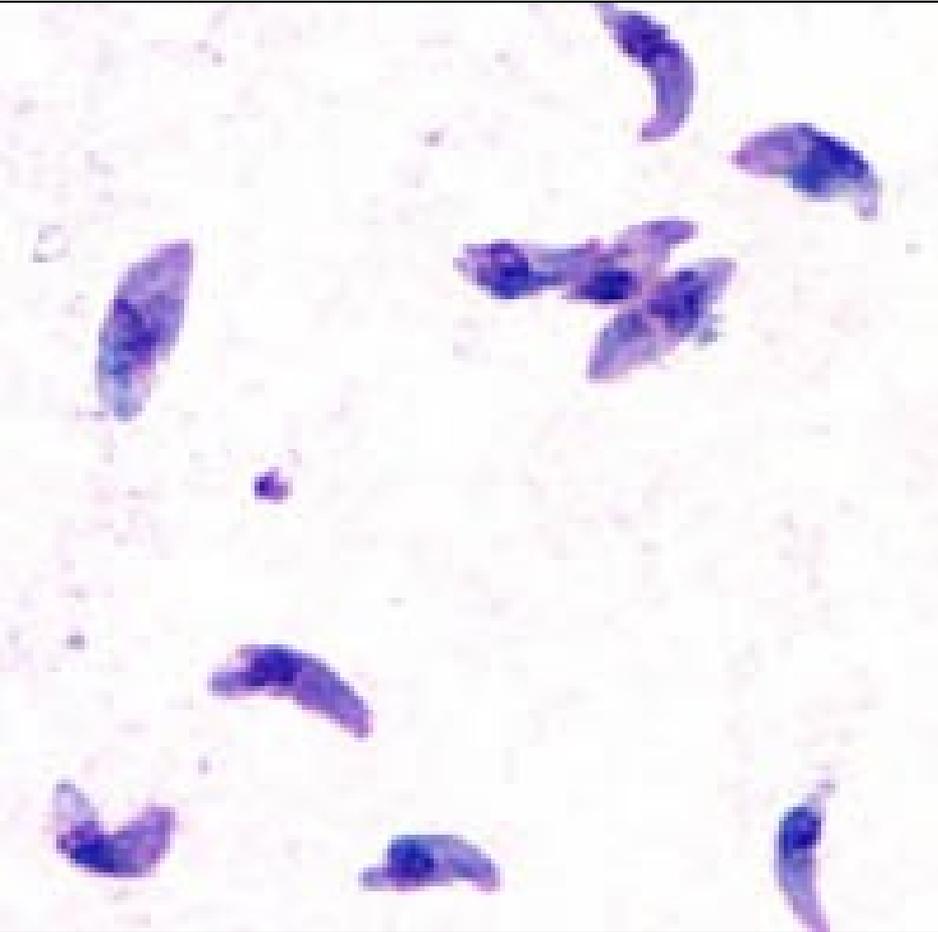


Диагностика герпес-вирусов 6 и 8 типов

ВектоHNV-6-IgG	Выявление IgG к герпес-вирусу 6 типа
РеалБест ДНК ВГЧ-6	Набор реагентов для выявления ДНК вируса герпеса человека 6 типа методом ПЦР в режиме реального времени
ВектоHNV-8-IgG	Выявление IgG к герпес-вирусу 8 типа



Toxoplasma gondii



Внутриклеточный паразит, размером 4 – 7 мкм, паразитирующий в организме человека и животных практически во всех органах и тканях.

Жизненный цикл *T. gondii*



Риск инфицирования при первичном токсоплазмозе

Срок беременности (недели)	Риск заражения (%)	Исход
0- 8	17	Тяжёлые аномалии развития
8-18	25	Поражение ЦНС (гидроцефалия, микроцефалия, кальцификаты в тканях мозга, эписиндром), хориоретинит, микрофтальм
18-24	65	Нарушение функций различных органов (гепатоспленомегалия, желтуха, анемия, тромбоцитопения)
24-40	80	Субклинические проявления болезни с манифестацией через несколько лет (глухота, хориоретинит, нарушение психомоторного развития)



Диагностика токсоплазмоза

- Выявление специфических IgG
- Выявление специфических IgM и IgA
- Выявление ДНК *T. gondii*



Алгоритм обследования беременных женщин для диагностики токсоплазмоза



Токсоплазмоз, клинические примеры

Динамика маркеров при первичном инфицировании

Пациентка Ф., гинеколог, обследование до беременности

в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест»:

Результаты анализа

Дата забора	IgM, D-1760	IgM, D-1756	IgG, D-1752 МЕ/мл	ИА IgG, %
26.09.04	2,72	1,35	376	12
09.11.04 (45 дн.)	2,10	0,48	1630	15
08.06.05 (8,5 мес.)	0,47	Отр.	4130	57



Токсоплазмоз, клинические примеры

Результаты обследования беременных женщин
п. Кольцово на наличие антител к токсоплазме.

	Маркеры токсоплазменной инфекции		
Всего пациентов	IgG+	IgG+, IgM+, IgA+	Отсутствие маркеров
79 (100%)	22 (27,5%)	1 (1,3%)	66 (83,2%)

-серонегативные (группа риска) впоследствии не приходят на контроль!
из 66 повторно обследовались 5 (7,5%)



Токсоплазмоз, клинические примеры

Результаты выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в тканевых образцах у детей с пороками развития

Группа детей, кол-во	Выявлена ДНК Т. G
Выкидыши, 31	14 (45%)
Мертворожденные, 10	3 (30%)
Умершие в неонатальный период, 37	6 (16%)
Всего 78	23 (29,5%)



Диагностика вируса токсоплазмоза

ВектоТоксо-IgG	Определение IgG к <i>Toxoplasma gondii</i>
ВектоТоксо-IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к <i>Toxoplasma gondii</i>
ВектоТоксо-IgM ВектоТоксо-IgA	Определение IgM к <i>Toxoplasma gondii</i> Определение IgA к <i>Toxoplasma gondii</i>
Токсо-IgM-ИФА-БЕСТ	Определение IgM к <i>Toxoplasma gondii</i> методом «захвата»
ВектоТоксо-антитела	Определение суммарных антител к <i>Toxoplasma gondii</i>
РеалБест ДНК <i>Toxoplasma gondii</i>	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Toxoplasma gondii</i> методом ПЦР в режиме реального времени



Диагностика краснухи



Краснуха

Заболевание обусловлено инфицированием
ВИРУСОМ КРАСНУХИ (тогавирус)

Характерные особенности

- Относительно лёгкое течение заболевания
- Наличие стёртых форм
- Высокая контагиозность
- Длительное выделение вируса из организма (до трех недель после инфицирования)

Всё это способствует вовлечению в инфекционный процесс большого количества населения.



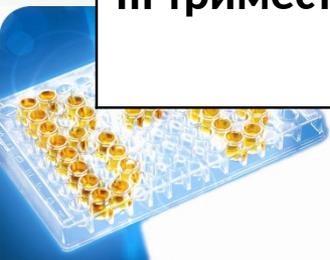
Вирус краснухи характеризуется двумя уникальными особенностями:

- **выраженным тератогенным эффектом**
- **высокой проникающей способностью через плаценту**

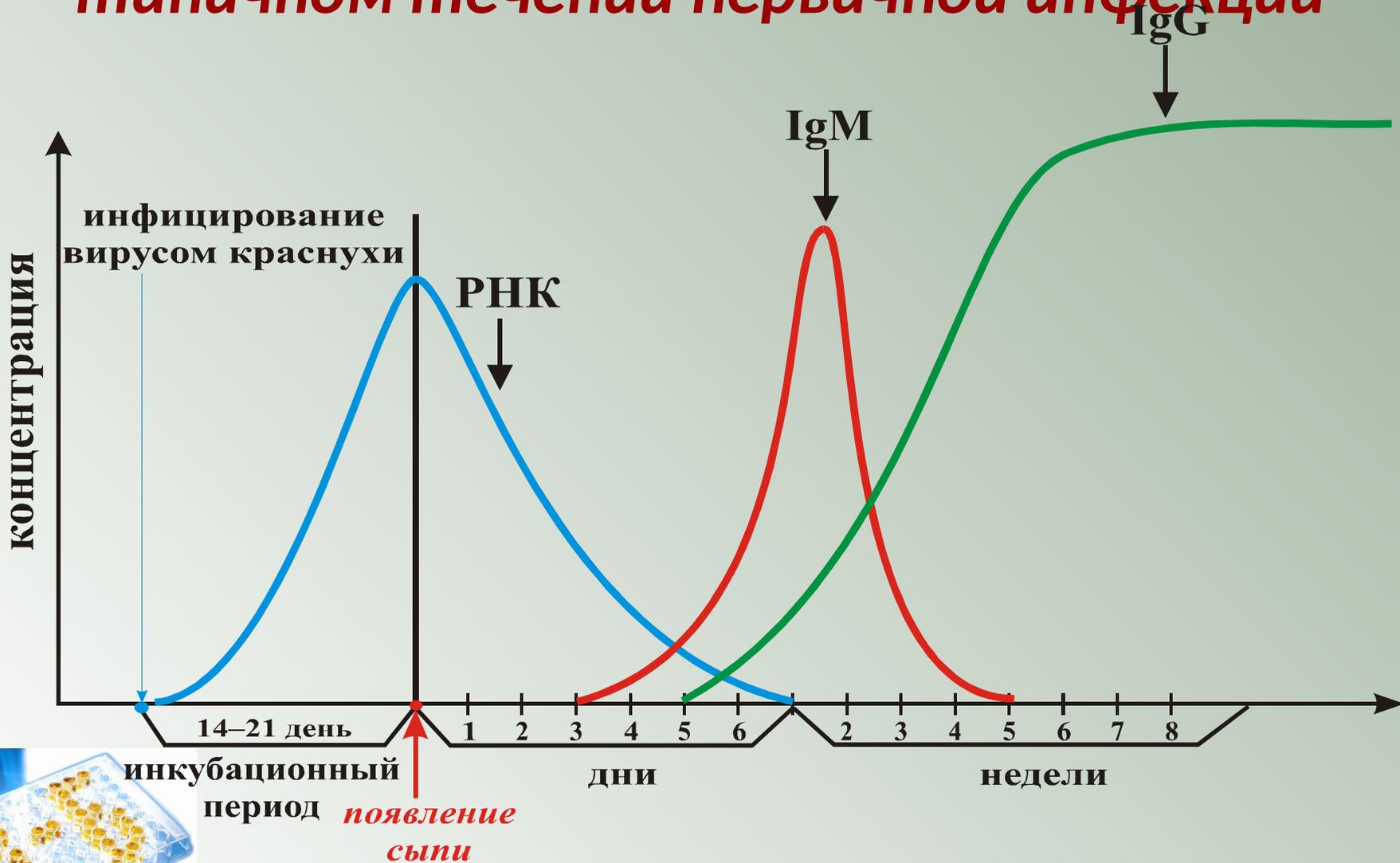


Риск инфицирования плода при первичной краснухе

Срок беременности	Риск	Исходы
I триместр	75-90% (60-80%)	20% - выкидыши 90% - уродство плода
II триместр	50-75% (30-40%)	20% - глухота
III триместр	25-50% (10-20%)	Функциональные нарушения различных органов



Динамика маркеров вируса краснухи при типичном течении первичной инфекции



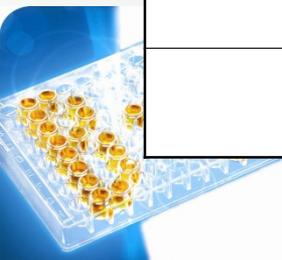
Диагностика краснухи

- Выявление специфических IgG, определение индекса авидности
- **Выявление специфических IgM**
- Выявление РНК краснухи



Варианты возможных результатов

IgM	IgG	Индекс авидности, %
-	-	-
+	-	-
+	+	< 50
+	+	> 50
-	+	< 50
-	+	50-70
-	+	> 70



Интерпретация результатов

IgM	IgG	Индекс авидности, %
-	-	-

Антитела класса IgM и IgG не определены, но это не означает, что пациент не инфицирован вирусом краснухи. Если кровь взята у больного в начале острой фазы заболевания, IgM и IgG в сыворотке крови могут отсутствовать, поэтому при подозрении на наличие инфекции (контакт, клинические проявления) рекомендуется исследовать сыворотку, взятую через 10-15 дней на наличие IgM и IgG повторно.



Интерпретация результатов

IgM	IgG	Индекс авидности, %
+	-	-

Возможна начальная стадия инфекции, необходимо проведение повторного анализа, рекомендуется исследовать сыворотку, взятую через 10-15 дней после 1-го забора крови, на наличие IgM, IgG и ИА авидности для выявления сероконверсии и подтверждения факта первичного инфицирования.



Интерпретация результатов

IgM	IgG	Индекс авидности, %
+	+	< 50
Первичная инфекция		
+	+	> 50

Большая вероятность ранее перенесённой инфекции, необходимо исследовать сыворотку на наличие РФ-М, причём необходимо проведение повторного анализа таких сывороток для исключения ложноположительных результатов (особенно по IgM), обусловленных случайными несистемными ошибками при постановке анализа.



Интерпретация результатов

IgM	IgG	Индекс авидности, %
-	+	< 50
Недавно перенесённая первичная инфекция (заболевание первичной краснухой было 2-3 месяца назад).		
-	+	50-70
Серая зона по авидности, установить срок инфицирования трудно, необходимо исследовать такую сыворотку через 20-30 дней, при факте недавнего первичного инфицирования индекс авидности должен увеличиться.		
-	+	>70
Ранее перенесённая инфекция		



Алгоритм обследования беременных женщин для диагностики краснухи

Положительный результат

Ранее перенесенная инфекция

Г
IgM (-)
IgG (+)
ин. Авид.>70%

Д
IgM (+)
IgG (+)
ин. Авид.>70%

Определение
РФ-М

Г – наст-инфекция

Д – наст-инфекция при наличии в крови РФ-М



Краснуха, клинические примеры

Своевременная диагностика

Беременная М., 35 недель: 13.03 – клинические проявления, сыпь; сдавала кровь на анализ в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест» 18.03 и 24.03.

Результаты обследования

Дата (дни после клиники)	IgM, ОП	IgG, ОП	ИА, %
18.03 (5 дней)	3,32	0,58	10,0%
24.03 (11 дней)	2,97	2,21	12,5%



Вывод: первичная краснуха, подтвержденная лабораторным анализом.

Краснуха, клинические примеры

Дифференциальная диагностика

Пациентка Н., 33 г., 12.06 – клинические проявления, сыпь, поставлен диагноз «псевдотуберкулез», обратилась в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест»

Результаты обследования

Дата (дни после клиники)	IgM	IgG	РНК вируса (ПЦР)
14.06 (2 дня)	-	-	+
27.06 (15 дней)	+	+	+
03.07 (21 день)	+	+	+
18.07 (36 дней)	+	+	+
18.10 (4 месяца)	-	+	-

Вывод: диагноз по клиническим проявлениям был поставлен неправильно. Лабораторно подтвержденный диагноз - первичная краснуха.



Краснуха, клинические примеры

Ошибки при обследовании

Беременная К., 35 недель: первичное обследование в диагностическом центре г. Новосибирска 10.12.02:

маркер	IgM	IgG
результат	Отр.	Отр.

Вывод: беременная К. входит в группу риска в отношении краснухи.

24.03.03 краснухой заболел брат, диагноз подтвержден в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест» исследованием его сыворотки от 31.03.03:

маркер	IgM	IgG	ИА IgG,%
результат	Полож.	Полож.	10%

Диагноз: краснуха, подтверждена лабораторными исследованиями.

Контакт беременной К. из группы риска с больным краснухой мог привести к ее инфицированию краснухой, поэтому был проведен анализ сыворотки крови беременной К., взятой 05.04.03, в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест»:

маркер	IgM	IgG	ИА IgG,%
результат	Отриц.	Полож., 85,4 МЕ/мл	96%

Вывод: отсутствие IgM при высокой концентрации IgG и индексе авидности 96% указывает на давнюю (более 5 месяцев назад) инфекцию. При обследовании в диагностическом центре г. Н-ска были получены неправильные результаты.



Краснуха, клинические примеры

Ошибки при обследовании

Беременная Л., 16 недель:

первичное обследование в КДЛ ЗАО «Вектор-Б

IgG - 200 МЕ/мл

(результат определения IgG был выдан в МЕ/мл)

Через 1,5 месяца в другой лаборатории было проведено повторное обследование (после контакта с заболевшей краснухой дочерью):

IgG - 1: 400

(результат определения IgG был выдан в титре)

Врач, **не обратив внимание на разные единицы измерения**, решила, что концентрация IgG растет, направила на анализ РНК краснухи кровь плода в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест».

Результат анализа - отрицательный.

Ребенок родился здоровым.

Ошибки: 1 – не был заказан анализ IgM ни при первичном, ни при повторном обследовании;

2 – не было необходимости обследовать беременную по поводу контакта с больным краснухой (не из группы риска);

3 – не был заказан анализ индекса авидности IgG при повторном обследовании.



При правильном заказе анализов забора крови плода можно было избежать.

Краснуха, клинические примеры

Ошибки при обследовании

Беременная И., возраст 36 лет, срок беременности 10 недель, желанный ребенок:
результаты обследования в диагностической лаборатории "N" г. Новосибирска:
Направлена на прерывание беременности.
Обратилась в КДЛ ЗАО «Вектор-Бест».

IgM - полож., IgG - полож.

Результаты анализа

IgM	IgG	ИА IgG	РФ-М	IgM после удаления РФ-М	РНК вируса в крови мамы	РНК вируса в крови плода
+	+	92%	+	-	-	-

Рекомендовано оставить беременность. Ребенок родился здоровым.

Вывод: положительный результат при определении IgM обусловлен наличием в крови одновременно специфических IgG и ревматоидного фактора класса М.

Ошибки: - при первичном обследовании не определен индекс авидности IgG;
- не определена динамика маркеров в парных образцах сыворотки;
- не определяли РФ-М.



Диагностика краснухи

Векто-Рубелла- IgG	Определение IgG к вирусу краснухи
Векто-Рубелла- IgM	Определение IgM к вирусу краснухи
Векто-Рубелла- IgG-авидность	Определение индекса авидности IgG к вирусу краснухи
Рубелла - IgM-ИФА-БЕСТ	Определение IgM к вирусу краснухи методом «захвата»



Обязательные критерии лабораторного исследования при первичном инфицировании

- **Изменение ОП IgM**
- **Изменение концентрации IgG**
- **Индекс авидности < 40%**
- **Выявление антигена**



Принципы лабораторной диагностики ИФА-ТоRCH-инфекций

- Серологическое обследование должно проводиться до введения препаратов крови;
- Оценка результатов серологических исследований должна проводиться с учетом возможных особенностей функционирования иммунной системы пациента;
- Серологическое обследование должно проводиться методом **«парных сывороток»** с интервалом 14-21 день, которое выполняется одним и тем же методом в одном и том же диагностическом учреждении;
- Серологическое обследование новорожденных и детей первых месяцев жизни должно проводиться с одновременным серологическим обследованием матерей.



Спасибо за внимание



Наиболее распространенными методами для диагностики ToRCN- инфекций являются ИФА и ПЦР.

Методом ПЦР можно установить наличие или отсутствие возбудителя в организме.

Метод ПЦР важен при диагностике хронических и бессимптомных инфекций, он позволяет выявить ничтожно малое количество возбудителя.

Однако отличить с помощью ПЦР острую или недавнюю инфекцию от носительства невозможно. Для этого нужен ИФА для выявления антител.