

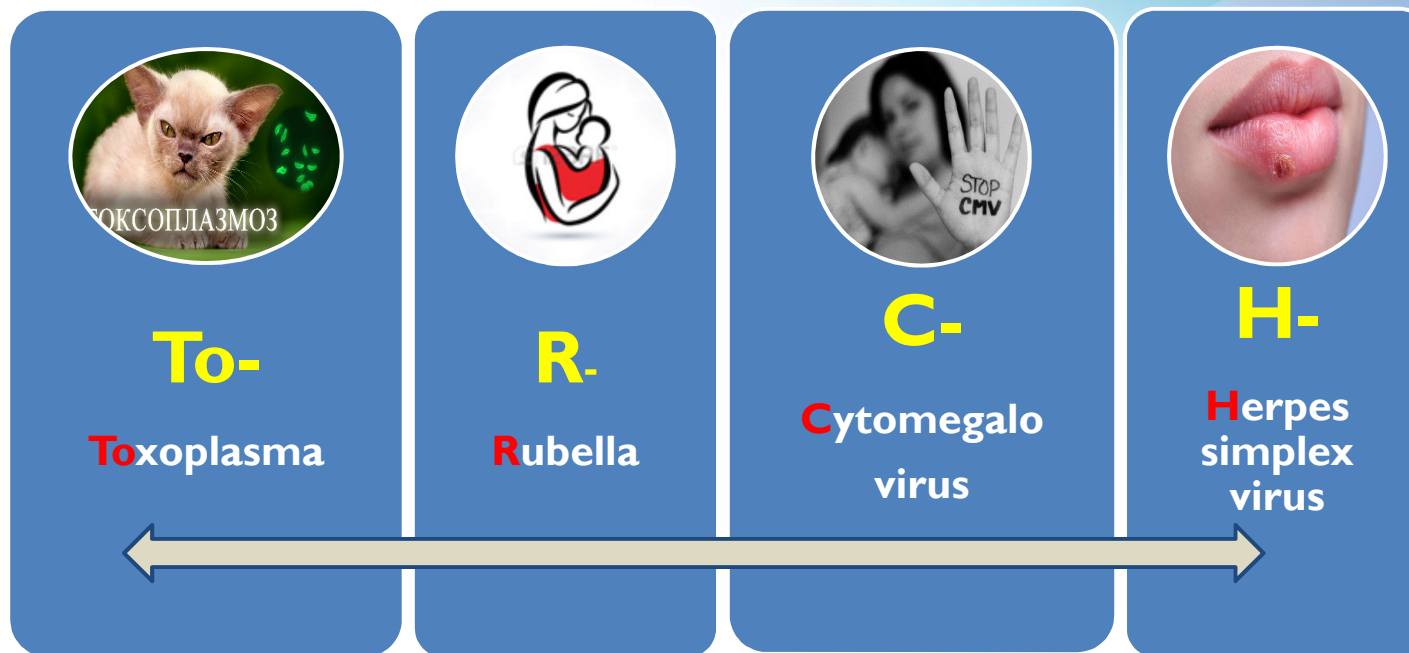
# Диагностика ToRCH-инфекций. Способы повышения специфичности тест-систем ЦМВ IgM



Крылова Ольга, руководитель направления  
инфекционной диагностики Алкор Био



## ToRCH-инфекции



**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](http://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**

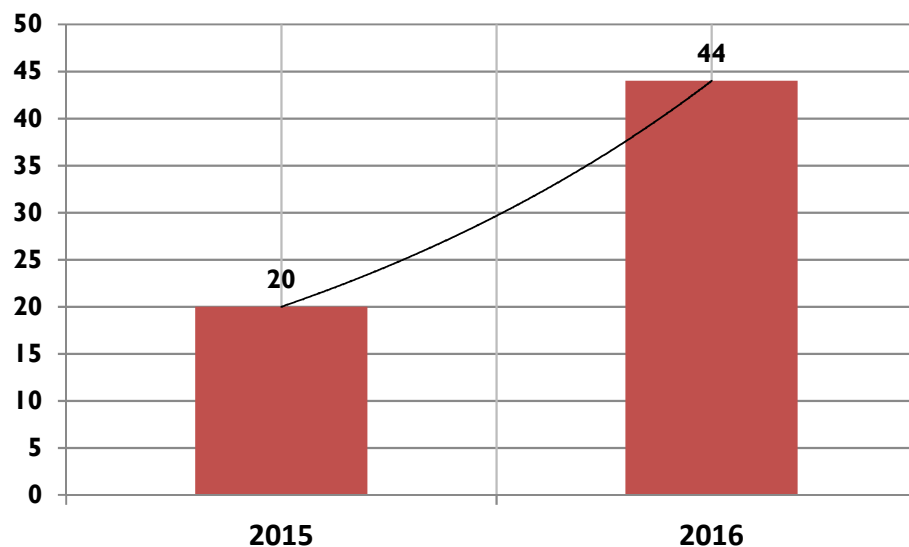
**К концу 2020 г. Завершить ликвидацию краснухи, по меньшей мере, в 5 регионах ВОЗ.**



## 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 )



**Роспотребнадзор опубликовал данные за первые 7 месяцев 2017 года о заболеваемости по ряду инфекционных заболеваний: всего 4 случая краснухи.**

«Сегодня мы практически элиминировали корь, - сказал [Геннадий Онищенко](#), указав, что количество заболевших приблизилось к показателю устойчивого достижения элиминации кори и краснухи – менее 1 случая на миллион населения.

Цель государственной программы «Элиминация кори и краснухи в РФ» (2016-2020 годы) - верификация элиминации к 2020 году, что будет достигаться высоким уровнем охвата населения прививками.



# МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ToRCH-инфекций:

Способ  
определения  
инфекционного  
агента

ПРЯМЫЕ МАРКЕРЫ

НЕПРЯМЫЕ МАРКЕРЫ

РИФ, ИГЦХ, ПЦР и др.

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,

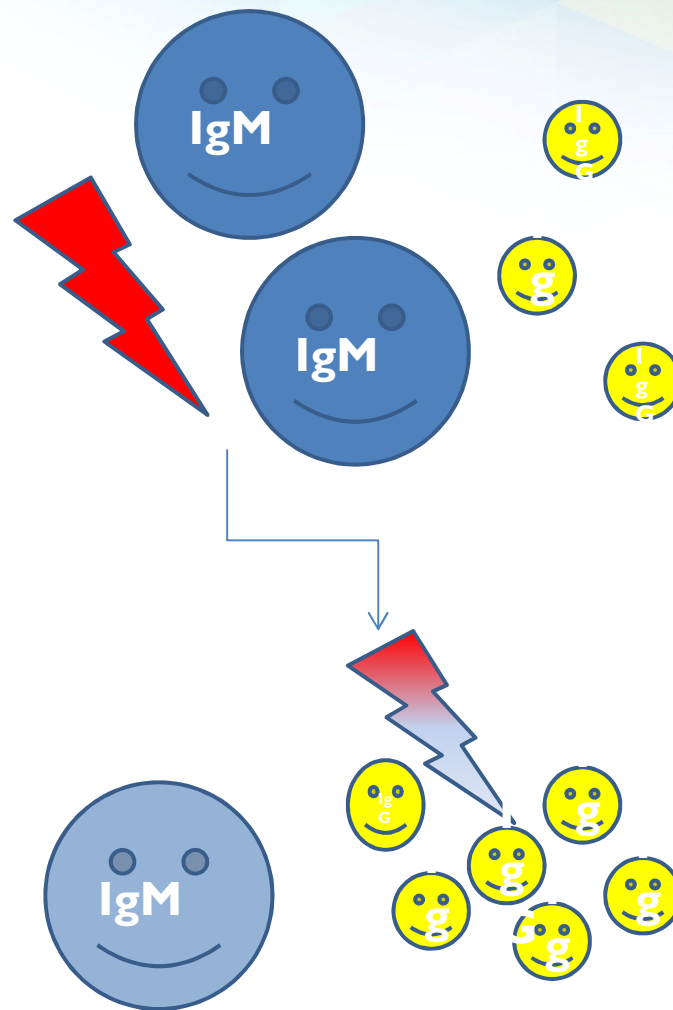


. **Антиген** - структурный элемент вирусной (микробной) частицы. 

**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  $A_v = \Sigma(a_{f1} + a_{f2} + a_{fn} \dots +)$ )**



Высокоавидные



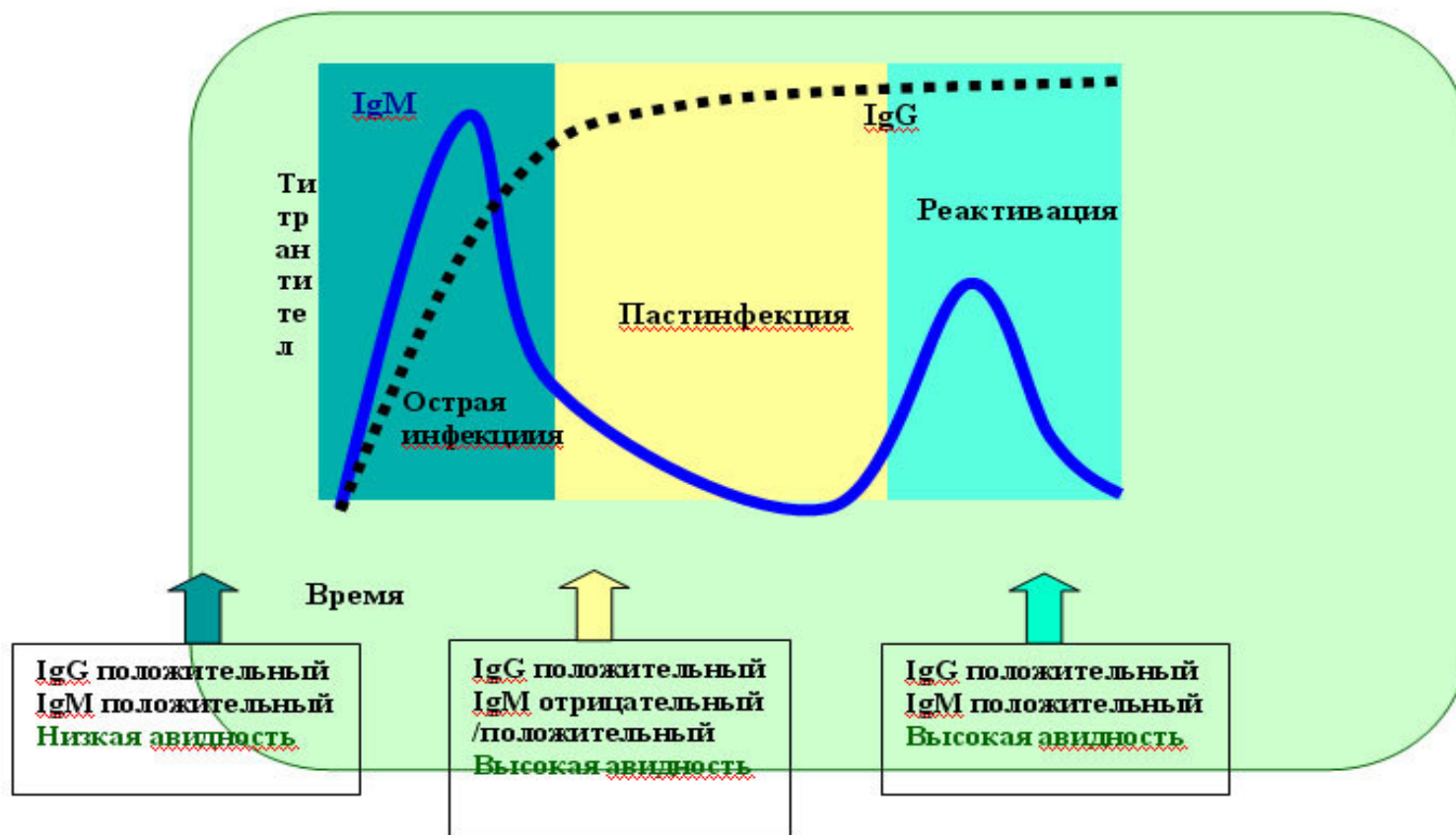
Низкоавидные



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

## Свойства антител





<u>IgG</u>	<u>IgM</u>	<u>Авидность</u>	<u>Диагноз</u>
Отрицательный	Отрицательный		Нет инфекции
Положительный	Положительный	Низкая	Острая инфекция
Положительный	Положительный	Высокая	Реактивация
Положительный	Отрицательный	Высокая	Пастинфекция



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



**ToRCH-Radim:**  
классификация по трем сходным схемам постановки



**IgM-**  
**«capture»**

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

**IgG**  
**кач./колич**

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

**IgG**  
**авидность**

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



ISO 9001  
Certificate №  
RU 227131





## Кач./колич. IgG "Radim"

**T**оxoplasma «Токсоплазма IgG»

**R**ubella «Краснуха IgG»

**C**ytomegalovirus «ЦМВ IgG»

### ДВУХСТАДИЙНЫЙ «СЭНДВИЧ»

Общее время основных инкубаций 60+30 мин

( планшет заклеен пленкой)

Готовый Cut-Off и CAL

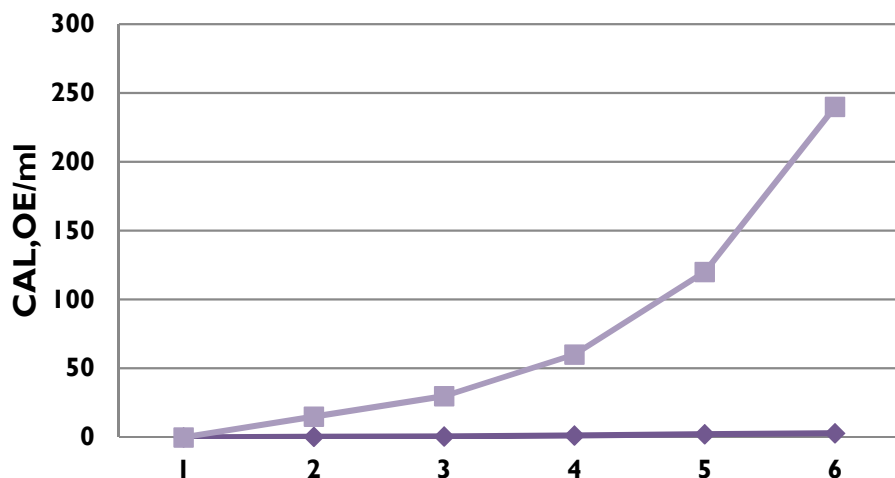
**Качественный анализ: Rubella**

ОП neg CAL 0

ОП Cut-Off CAL 15

Если ОП < ОП Cut-Off не реактивен

### Калибровочная кривая



### Количественный анализ

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

CAL 0 ME/мл 0.015

**CAL 15 ME/мл 0.309**

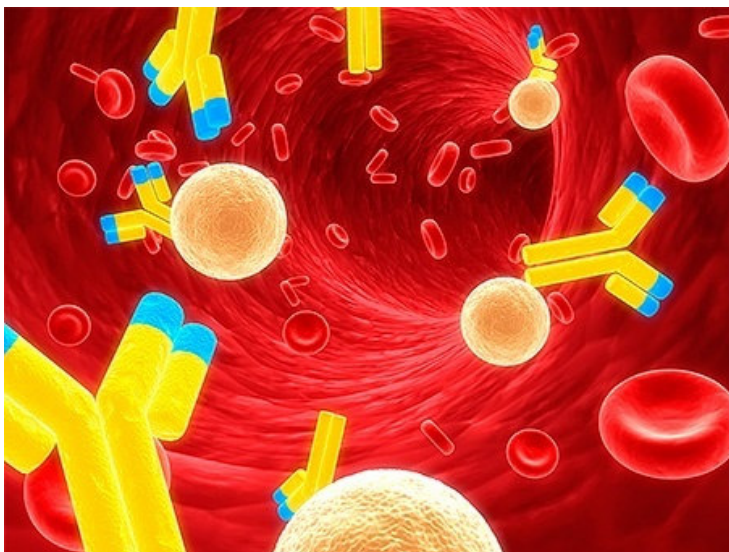
**CAL 30 ME/мл 0.591**

CAL 60 ME/мл 1.280

CAL 120 ME/мл 2.170

CAL 240 ME/мл 2.898





## IgG Avidity “Radim”

**T**охорlasma «Токсоплазма IgG-авидность»

**R**ubella «Краснуха IgG-авидность»

**C**ytomegalovirus «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 (мочевинной) для удаления низкоавидных тел

**$K_{avid} (\%) = \frac{ОП \text{ с реагентом для диссоциации}}{ОП \text{ без обработки}} \times 100$**

*Для краснухи :*

*ИА < 40% - низкая авидность*

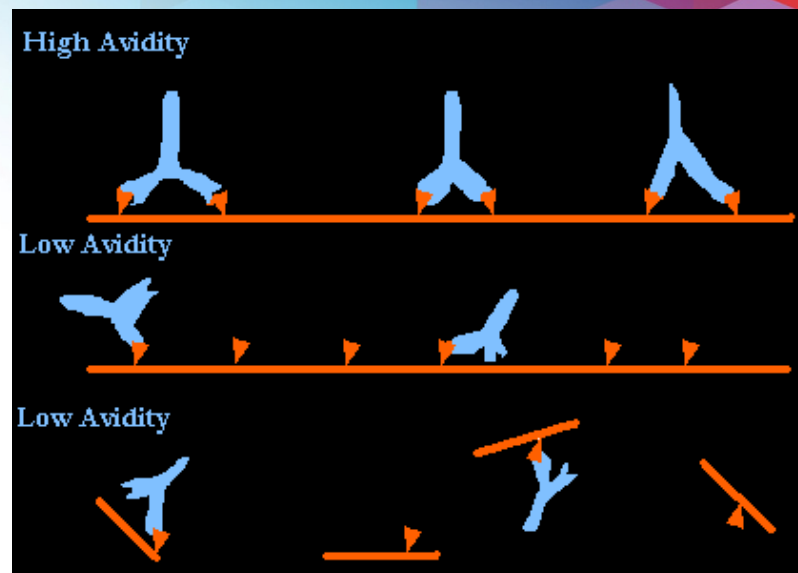
*ИА 40-60% - промежуточная авидность*

*ИА > 60% - высокая авидность*



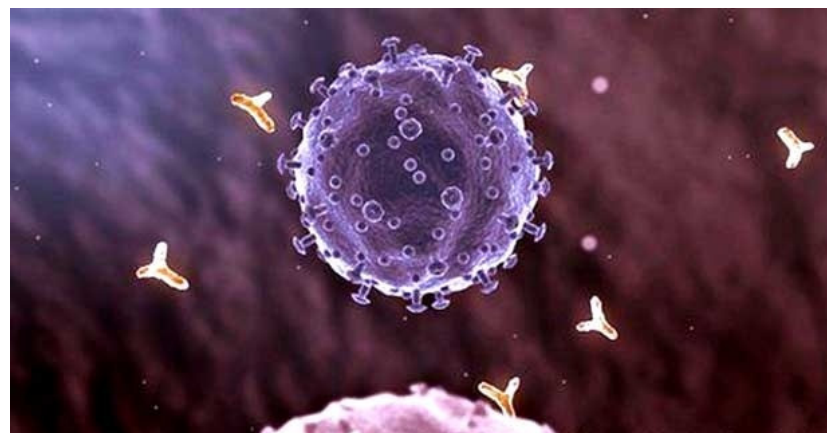
## IgG Avidity “Radim”

Схематическое изображение  
принципа  
ИФА-выделения низкоавидных  
антител



## DISS-

Реагент для диссоциации -  
раствор с мочевиной удаляет  
низкоавидные тела



## Качественный IgM “Radim”

**T**оxoplasma «Токсоплазма IgM»

**R**ubella «Краснуха IgM»

**C**ytomegalovirus «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**



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

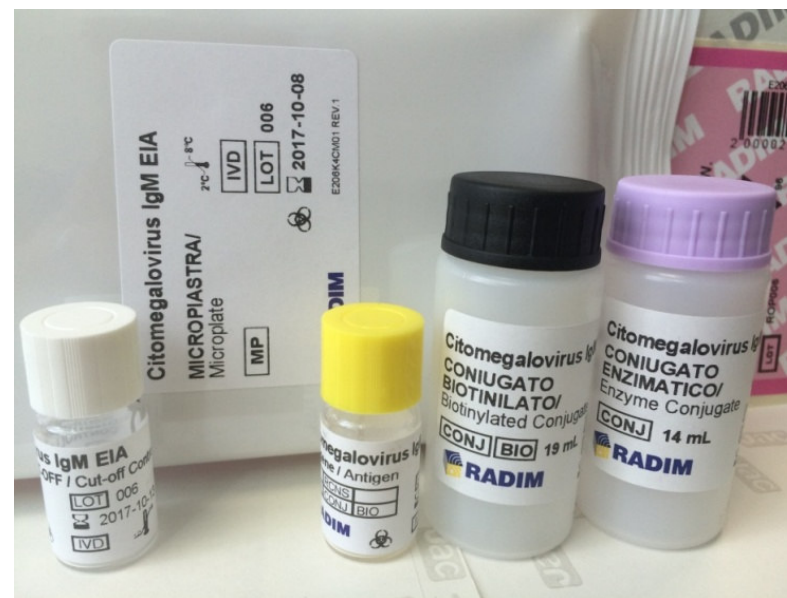
N.B.! Присутствие антигенспецифических IgM дает возможность выявить период острой фазы быстро по единственному образцу сыворотки!

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

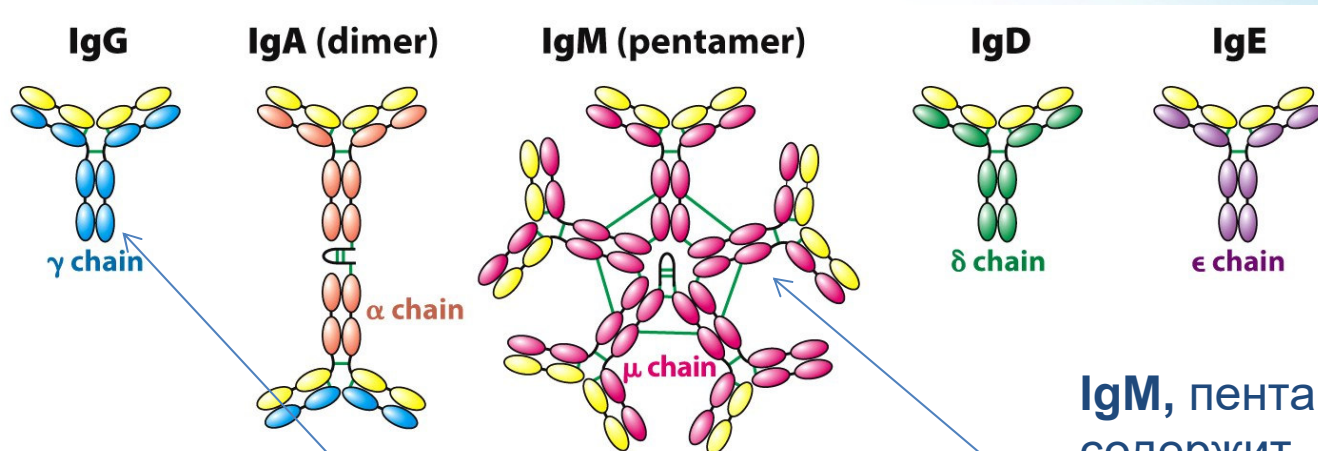
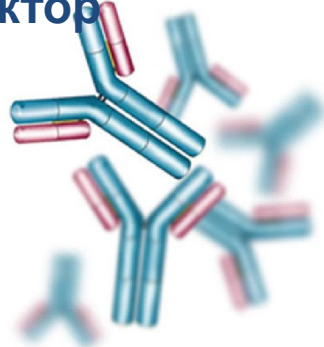
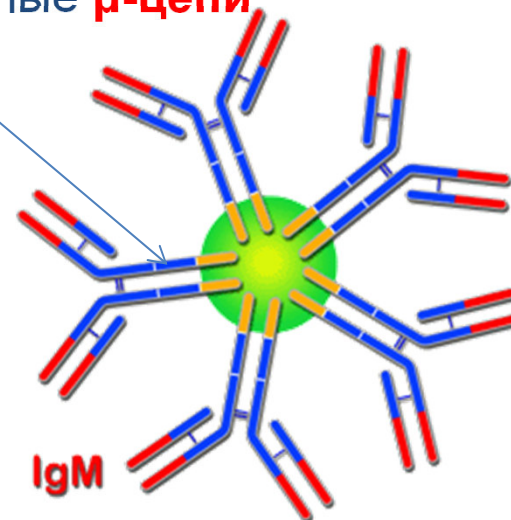


Figure 34.8  
Biochemistry, Seventh Edition  
© 2012 W. H. Freeman and Company

**IgG**  
и релматоидный фактор  
содержат  
**γ-цепи**



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



# Метод « $\mu$ -capture» «ЦМВ IgM» Radim - воздействие на $\mu$ -цепь IgM

На планшете :

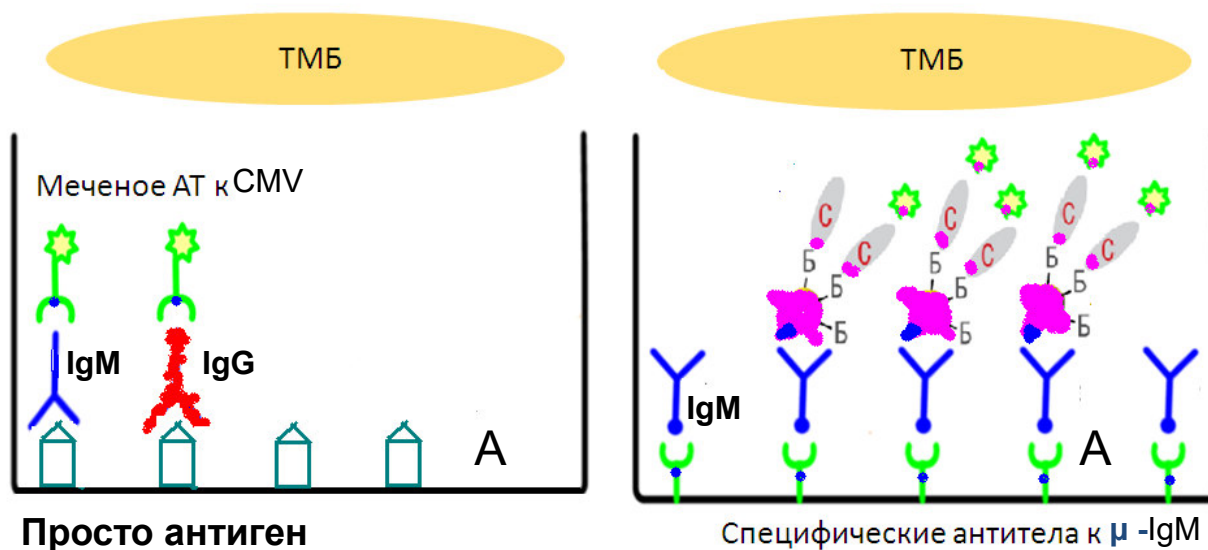
антитела против  $\mu$ -цепей антител IgM

Варианты ИФА-анализа

«СЭНДВИЧ»

«capture»-вариант

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



## Что дает «μ-capture»?

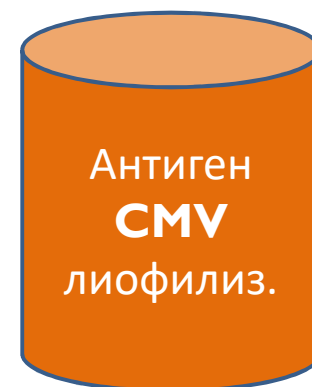
Это указано в инструкции к тест-системе «ЦМВ IgM» Radim:

- 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**



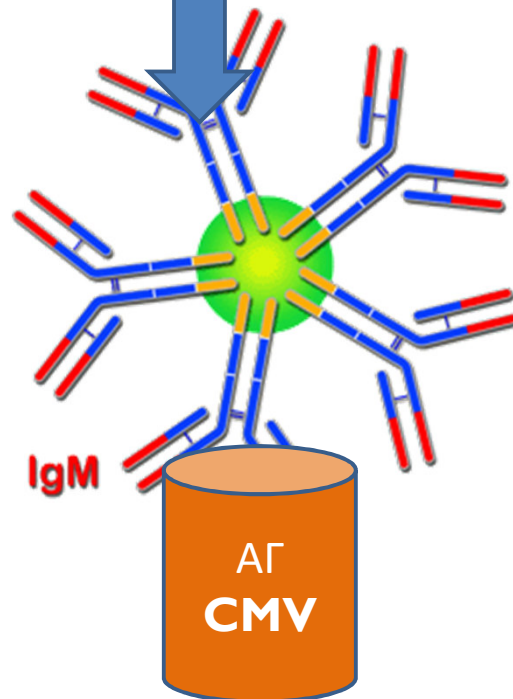
Лиофилизат антигена CMV  
при внесении в биотин! (конъюгат N1)  
позволяет полностью  
убрать перекрестное влияние в тест-системе  
«ЦМВ IgM» Radim !





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

«capture»-антитела против  $\mu$ -цепей антител  
IgM



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



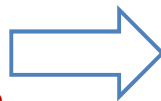
## ВЫБИРАЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДИКИ, **N.B!**

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

Что повышает чувствительность в тест-системах Radim?

**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ИНКУБАЦИИ С ДВУМЯ КОНЪЮГАТАМИ  
ВАЖНЫ ДЛЯ ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ!**

первая инкубация с биотином  
**Тест-система «ЦМВ IgM» Radim**



вторая инкубация со стрептавидином



одна инкубация 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

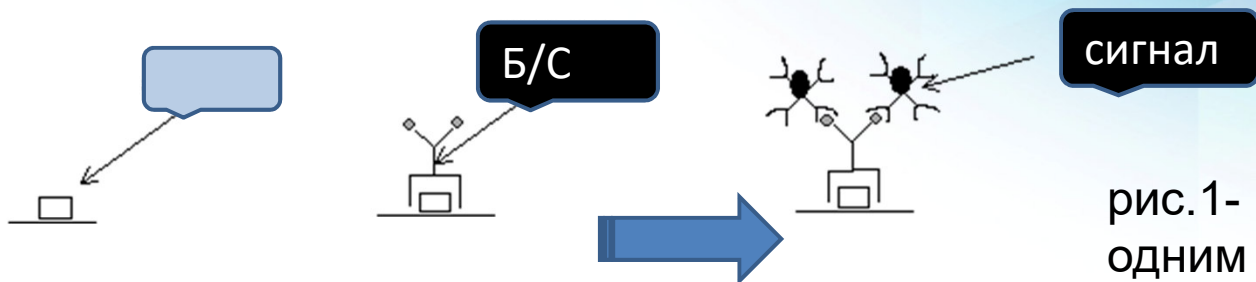


рис.1- инкубация с одним конъюгатом Б/С-Биотин/Стрептавидин

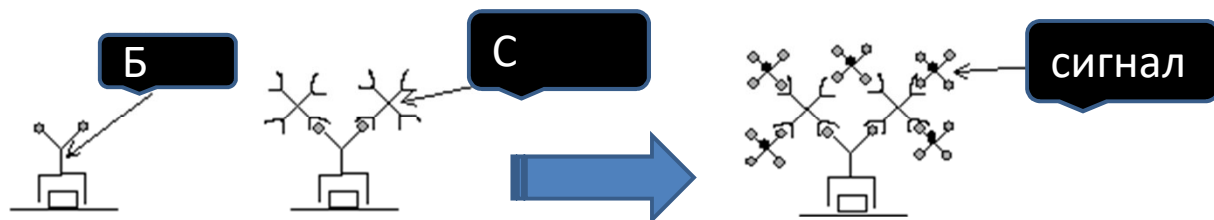


рис.2- две последовательные инкубации с конъюгатами: Б-биотин, потом С-стрептавидин

**«... 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  $\mu$ -цепь IgM**
- 2 инкубация - лиоф. Антигена ЦМВ + конъюгат биотин**
- 3 инкубация - с меткой конъюгат стрептавидин**



**Длительность постановки –  
ряд последовательных инкубаций-  
гарантия качества наборов Radim**



**ЧТО ДЛЯ ВАС ВАЖНЕЕ?**

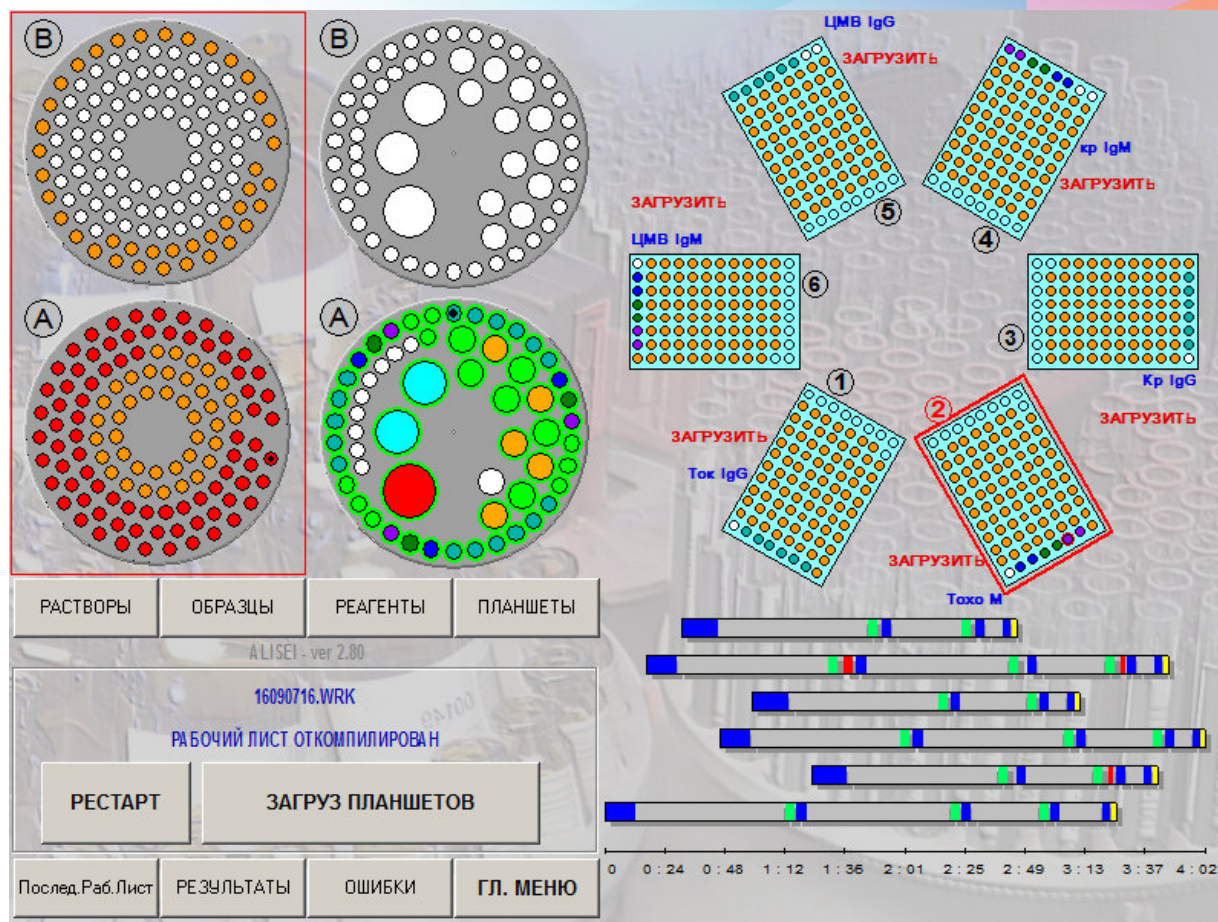


## ToRCH-Radim –это дополнительно:

- **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**



