

ДП Науково-технічний центр імунобіотехнології
НТК „Інститут монокристалів” НАНУ
Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”

СПЕЦИФИЧНА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА TORCH-ІНФЕКЦІЙ

Практичний посібник

Київ-2004

Специфічна лабораторна діагностика TORCH-інфекцій
Практичний посібник

Під редакцією доктора медичних наук,
професора А.Л.Гураля

Автори: Раєвська Г.Є., Михайленко Л.П., Ганова Л.О.,
Донська Є.С., Іванська Н.В.

Науково-виробнича компанія “Діапроф-Мед”, використовуючи новітні досягнення генної інженерії, молекулярної біології, гібридної технології та імунобіотехнології, опрацювала повний цикл виробництва імуноферментних тест-систем для діагностики TORCH-інфекцій.

У даному посібнику викладено основні дані з етіології, патогенезу, епідеміології та специфічної діагностики токсоплазмозу, краснухи, цитомегаловірусної та герпетичної інфекцій. Представлено наявні відомості з інформативності (чутливості, специфічності та відтворюваності результатів) імуноферментних тест-систем, призначених для діагностики вказаних інфекцій.

Для лікарів-лаборантів, вірусологів, імунологів, мікробіологів, епідеміологів, лікарів загально-терапевтичного профілю, студентів вищих навчальних закладів та аспірантів.

Київ, „Діапроф-Мед”

Скорочення, використані в тексті посібника:

АГ – антиген;
 АНВ – антитіла, що нейтралізують вірус;
 АТ – антитіло;
 ВК – вірус краснухи;
 ВПГ – вірус простого герпесу;
 ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;
 ГЗ – граничне значення (показника оптичної густини);
 ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією;
 ІЛ – інтерлейкін;
 ІФА – імуноферментний аналіз;
 ІФН – інтерферон;
 К⁺ – позитивний контроль;
 К⁻ – негативний контроль;
 МКАТ – моноклональні антитіла;
 МО – міжнародна одиниця;
 ОГ – оптична густина;
 ОО – оптична одиниця;
 ПКК- природні клітини-кілери;
 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;
 РБ – реакція з барвником Себіна-Фельдмана;
 РЗГА – реакція затримки гемаглютинації;
 РФ – реакція імунофлуоресценції;
 РЛА – реакція латексаглютинації;
 РН – реакція нейтралізації;
 РНГА – реакція непрямої гемаглютинації;
 РНІФ – реакція непрямої імунофлуоресценції;
 СВК – синдром вродженої краснухи;
 ТІФА – твердофазний імуноферментний аналіз;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 ЦМВ – цитомегаловірус;
 ЦМВІ – цитомегаловірусна інфекція;
 ЦНС – центральна нервова система;
 ВВІ – Boston Biomedical Incorporation;
 CDC (U.S.A. Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;

CV (coefficient of variation) - коефіцієнт варіації;
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – твердофазний імуноферментний аналіз, ТІФА;
FRET – fluorescent resonance energy transfer;
HBsAg (surface antigen of the hepatitis B virus) – поверхневий антиген вірусу гепатиту В;
HCV (hepatitis C virus) – вірус гепатиту С;
HIV (human immunodeficiency virus) – ВІЛ, вірус імунодефіциту людини;
HTLV (human T-cell leukemia virus) – вірус лейкемії Т-клітин людини;
IgA, IgG, IgM – імуноглобуліни класів А, G та M;
USA FDA (USA Food and Drug Administration) – Агенція США з питань продовольства та медикаментів.

Зміст

Скорочення, використані в тексті посібника	3
Вступ	5
Токсоплазмоз	7
Краснуха	32
Цитомегаловірусна інфекція	53
Герпес	73

ВСТУП

14. Cherpes T.L., Ashley R.L., Meyn L.A., and Hillier S.L. Longitudinal reliability of focus glycoprotein G-based type-specific enzyme immunoassays for detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 in women. *J. Clin. Microbiol.* – 2003. - V. 41. – № 2. - p.671-674.
15. Corey L., Spear P.G. Infections with herpes simplex viruses. *N. Engl. J. Med.* – 1986. – V. 314. – p.686-691.
16. Cowan F.M., Johnson A.M., Ashley R., Corey L., Mindel A. Relationship between antibodies to herpes simplex virus (HSV) and symptoms of HSV infection. *J. Infect. Dis.* – 1996. - V. 174. – p.470-475.
17. Munday P.E., Vuddamalay J., Slomka M.J., Brown D.W.G. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes. *Sex Transm. Inf.* – 1998. - V.74. - p.175-178.
18. Nilsen A., Ulvestad E., Marsden H., Langeland N., Myrmet H., Matre R., Haarr L. Performance characteristics of a glycoprotein as assays for detection of anti-HSV-2 antibodies in human sera. *J. Virol. Methods.* – 2003. – V. 107. – p.21-27.
19. Roest R.W., van der Meijden W.I., van Dijk G, Groen J, Mulder P.G., Verjans G.M. et al. Prevalence and association between herpes simplex viruses types 1- and 2-specific antibodies in attendees at a sexually transmitted disease clinic. – *Int. Epidemiol.* – 2001. – V.30. – p.580-588.
20. Whitley R.I. Herpes simplex virus infections. In: *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infants.* (Remington JS, Klein JO, eds). Philadelphia: WB Saunders. – 1990. – p. 282-305.

Дослідження і спостереження останніх років свідчать про те, що група вірусних і бактеріальних інфекцій (TORCH-інфекцій), які спричиняють стійкі структурні зміни у плоду та новонародженої дитини, належать до найважливіших проблем медичної науки та практики охорони здоров'я. Абrevіатуру TORCH утворено від початкових літер у назвах декількох поширених і достатньо небезпечних захворювань – токсоплазмозу (toxoplasmosis), краснухи (rubella), цитомегаловірусної інфекції (cytomegalovirus infection) і герпесвірусної інфекції (herpes virus infection). Крім того, до TORCH-інфекцій в складі групи “other” (“інші”) належать також сифіліс, хламідійні інфекції, гепатити А і В, ентеровірусні інфекції, лістеріоз.

Важлива особливість хвороб групи TORCH – частота їхніх асоціацій: кожне з цих захворювань поодиноці зустрічається рідше. Значно частіше виявляють змішані інфекції, коли їх викликають 2-3 збудники чи й більше.

Серйозність ушкодження плоду та новонароджених обумовлена відносною фізіологічною “незрілістю” імунної системи, а також значним її пригніченням, пов'язаним з імунодепресивною дією багатьох представників групи TORCH. Важливу роль відіграє одночасність та/або послідовність інфікування плоду різними збудниками, що персистують у материнському організмі чи потрапляють туди ззовні під час вагітності. Крім того, необхідно наголосити, що при змішаних інфекціях у багатьох випадках затушковуються та змінюються багато ознак окремих хвороб, розвиваються ускладнення, що призводять до тривалого рецидивного перебігу хвороби. Все це сильно ускладнює постановку клінічного діагнозу змішаних інфекцій та винятково підвищує роль лабораторної діагностики. Тому для своєчасного виявлення як “чистої”, так і змішаної інфекції, для проведення належних лікувальних заходів необхідно ретельно обстежувати дитину та матір (а часом і батька), причому робити це слід якомога раніше та повніше.

Значення інфекцій групи TORCH широко усвідомлене світовою медичною спільнотою. Наприклад, у Російської Федерації (Томськ, RIN) є спроба створити комп'ютерну мережу з метою обміну знаннями та досвідом в цій області, ширше зрозуміти деякі

закономірності поширення TORCH-інфекцій та можливості їхньої діагностики й профілактики. На велике значення захворювань, спричинюваних збудниками цієї групи, наголошують також недавні настанови Лондонського центру охорони здоров'я (Joint Venture of London Health Science Center and St.-Joseph Health Care London), матеріали ВООЗ, інструкції МОЗ України.

МОЗ України прийняв 20.12.2002 г. Постанову № 480 «Про перелік видів добровільного медичного обстеження осіб, що подали заяву про реєстрацію шлюбу», в якому окремо наголошується про необхідність обстеження новоодружених на TORCH-інфекції з метою запобігти народженню хворих дітей.

Література

1. Адашкевич В.П. Заболевания, передающиеся половым путем. – Витебск. – 1997. – 152с.
2. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. – К.: „Здоров'я” – 2002 - Т.3. – с. 82-114.
3. Гребенюк В.Н. Простой герпес (простой пузырьковый лишай). HERPES SIMPLEX. – Рус. мед. ж. – 1997. - Т. 5. – № 11. - с.5-11.
4. Исааков В.А., Борисова В.В. Неизвестная эпидемия: герпес. – Смоленск, 1997. – с.20-31.
5. Исаков В.А., Борисова В.В., Исаков Д.В. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика. Руководство для врачей. Лань. - 1999. – 192с.
6. Маричев І.Л. TORCH-інфекції: сучасні аспекти діагностики. - Лаб. діагностика. – 2004. - № 4. – с.43-46.
7. Марков И.С. Диагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза. - Киев: АртЕк. – 2002. – 192с.
8. Марченко Л.А. Генитальная герпетическая инфекция в акушерстве и гинекологии. – Акушерство и гинекология. – 1999. - № 1. – с.18-25.
9. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. Иммуниет и генитальный герпес. Новгород: М. - 1997. – 221с.
10. Сухих Г.Т., Марченко Л.А., Шуралина А.В. Состояние иммунной системы при генитальном герпесе. – Проблемы репродукции – 2000. - № 6. – с.1-5.
11. Торешин А.Т. Клиника, диагностика и лечение генитального герпеса у женщин. Пятигорск: Пятигорский НИИ курортологии.- 1999. – 17 с.
12. Benedetti J.K. Zeh J. & Corey L. Clinical reactivation of genital Herpes simplex virus infection decreases in frequency over time. Ann. Intern. Med. – 2000. - V.131. – № 1. - p.14-20.
13. Bogges K.A., Watts D.H., Hobson A.C., Ashley R.L., Brown Z.A., Corey L. Herpes simplex virus type 2 detection by culture and polymerase chain reaction and relation to genital symptoms and cervical antibody status during the third trimester of pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. – 1997 – V. 176. – p. 443-451.

антигени, щоб підтвердити чи заперечити діагноз герпетичної інфекції;

- поява специфічних антитіл класу IgM при рецидивному герпесі свідчить про загострення хвороби;
 - у складних випадках, коли клінічних даних бракує, при негативному результаті серодіагностики необхідно розширити дослідження, направлені на визначення вірусоспецифічних антитіл, та провести визначення антитіл проти ВПГ1 та ВПГ2 в динаміці (2-3 рази з проміжками 2-4 тижні);
 - при діагностуванні герпесу в новонароджених слід проводити тестування і на присутність специфічних антитіл класу IgM, і на підвищення рівнів IgG у двох послідовних тестах, бо у матері при первинній герпетичній інфекції антитіл може не бути. При цьому необхідно провести диференційну серодіагностику ВПГ1 та ВПГ2, бо хоча обидва типи вірусу можуть спричинити неонатальний герпес, присутність ВПГ2 дає гірший прогноз для новонародженого.
- Основні особливості та переваги тест-систем:
- Висока чутливість та специфічність;
 - Використання високоафінних моноклональних антитіл;
 - Пропоновані тест-системи можна легко пристосувати для повсякденного серологічного тестування;
 - Загальноприйнята стандартизація обліку результатів;
 - Використання малотоксичного та стабільного хромогену (ТМБ);
 - Один набір призначено для 96 аналізів;
 - Тривалість аналізу – 2,5 години.

ТОКСОПЛАЗМОЗ

Токсоплазмоз – паразитарне захворювання, викликане внутрішньоклітинним паразитом *Toxoplasma gondii*. Захворювання характеризується ураженням багатьох органів, поліморфізмом клінічних проявів – від латентних, субклінічних до тяжких форм (при вродженому токсоплазмозі та у ВІЛ-інфікованих). У більшості випадків токсоплазмоз протікає латентно чи хронічно, з ураженням нервової системи, органів ретикулоендотеліальної системи, м'язів (включаючи й серцевий м'яз) та очей. Хронічна та латентна форми інфекції можуть активуватися в хворих з пригніченням імунної системи (наприклад, при пересадженні органів, ВІЛ-інфекції тощо).

Актуальність проблеми пов'язана з широким розповсюдженням інфекції. Дослідження, проведені в різних країнах світу, доводять, що більшість дорослого населення інфіковано токсоплазмами. Вважають, що в деяких країнах токсоплазмозом інфіковано практично все населення [3]. Так, в країнах Західної Європи, серед дорослого населення антитіла класу IgG до токсоплазми визначаються у 13-18 і навіть у 25-50 %. В Африці, Центральній та Південній Америці позитивну реакцію на токсоплазмоз дають біля 90 % досліджених сироваток [9]. У США інфіковано від 5% до 30% осіб у віці 10-19 років та від 10 % до 67 % осіб, старших за 50 років. У країнах СНД інфіковано біля 30 % населення. Загальна кількість інфікованих у світі складає не менш як 500 млн. осіб [5, 11].

Етіологія та патогенез

Збудник хвороби – облігатний внутрішньоклітинний паразит *Toxoplasma gondii*, що належить до класу споровиків (Sporozoa), ряду Coccidia та типу найпростіших. В організмі людини токсоплазми існують у трьох основних формах: трофозоїти (ендозоїти), цисти та ооцисти. Трофозоїти мають розміри 2-4 x 4-7 мкм, формою нагадують півмісяць, добре фарбуються за методом Романовського-Гімза. Вони розмножуються в усіх клітинах ссавців, крім без'ядерних клітин (еритроцити), та виявляються в тканинах на гострій стадії інфекції. Скупчення трофозоїтів всередині однієї клітини називають псевдоцистою. На трофозоїти активно впливають різні хіміопрепарати

(хлоридин, сульфаміаїди, макроліди тощо); ці форми нестійкі поза клітиною та в довкіллі, швидко гинуть при висушуванні, прогріванні, при дезінфекції.

Цисти формуються в організмі хазяїна, мають власну щільну оболонку. Розміри їх до 100 мкм, всередині міститься 3.000-5.000 паразитів та більше. Крізь щільну оболонку цист не проникають ні антитіла, ні лікувальні препарати. Вони дуже стійкі проти різних впливів та зберігаються десятки років в організмі хазяїна. Більша частина їх локалізується в скелетних м'язах, міокарді, центральній нервовій системі [3, 11].

Ооцисти являють собою утворення овальної форми діаметром 10-12 мкм. Вони формуються у слизовій оболонці тонкої кишки деяких представників родини котячих та виділяються з фекаліями. За сприятливих умов ооцисти зберігаються в довкіллі до одного року та більше [1, 11]. Саме їм належить основна роль у передачі інфекції.

Поза організмом ооцисти перетворюються в інвазивні спорозисти. Потрапивши в тонку кишку людини (чи іншого проміжного хазяїна), спорозисти, що вийшли з спорозист під впливом протеолітичних ферментів, проникають в епітеліальні клітини слизової оболонки та починають швидко розмножуватися, утворюючи трофозоїти. Трофозоїти по лімфатичних та кровоносних судинах розносяться по всьому організму, а потім розмножуються в клітинах різних тканин.

Вибіркову тропність токсоплазми проявляють до нейронів головного мозку, клітин поперечносмугастих м'язів, серцевого м'яза, структур ока, клітин ретикулоендотеліальних органів. Як правило, внаслідок виникнення імунітету захворювання переходить у хронічну форму. Розмноження паразитів значно уповільнюється. Вони утворюють справжні цисти, які заповнені тисячами щільно прилеглих один до одного брадізоїтів. Цисти довго зберігаються в організмі.

Токсоплазми досить чутливі до впливу високих температур (гинуть через 10 хв. при температурі 55 °C), висушування, ультрафіолетового опромінення, швидко гинуть у 50 %-ному розчині спирту та 1 %-ному розчині фенолу. Збудник добре зберігається при низьких температурах; при температурі 4-5° C у молоці він не втрачає життєздатності протягом кількох діб, а в донорській крові – до 30 діб. У замороженому стані (до мінус 70 °C) у фізіологічному розчині з

На розроблених тест-системах перевірялися сироватки крові донорів – громадян України; показано, що антитіла класу IgG до ВПГ1 та ВПГ2 присутні у 96,8 % цих осіб; з них 20 % має антитіла до ВПГ2; такі дані збігаються з інформацією ВООЗ щодо поширення даного вірусу в країнах Європи (рис. 1).

Таким чином, результати проведених випробувань вітчизняних тест-систем, розроблених в компанії «Діапроф-Мед», доводять, що показники інформативності даних діагностикумів не відстають від показників, відомих для їхніх комерційних аналогів, рекомендованих FDA (США); отже, запропоновані тест-системи можуть використовуватись для серодіагностики інфекцій, спричинених ВПГ1 та ВПГ2.

Тлумачення результатів, отриманих при серодіагностиці герпетичної інфекції:

- виявлення специфічних сироваткових антитіл класу IgM при відсутності IgG до ВПГ або при чотирихкратному зростанні титрів специфічних IgG у парних сироватках, взятих у хворого з проміжком 10-12 днів, свідчить про первинну герпетичну інфекцію;
- виявлення специфічних антитіл класу IgM разом з антитілами класу IgG до ВПГ (при відсутності достеменного зростання титрів специфічних IgG) свідчить про загострення хронічної герпетичної інфекції;
- для постановки діагнозу активної герпетичної інфекції у складних випадках (при нетиповій чи безсимптомній інфекції) необхідно проводити комплексне обстеження хворих, яке включає визначення вірусоспецифічного антигену, аналіз серологічних показників у ході хвороби та оцінку імунного статусу хворого. Постановка діагнозу герпетичної інфекції, базована на самому лише серологічному дослідженні, може призвести до діагностичної помилки, оскільки низькі рівні протигерпетичних IgG не завжди бувають доказом відсутності активної герпетичної інфекції (при зниженій імунореактивності організму);
- виявлення титрів антитіл класу IgG проти ВПГ, вищих за середній рівень, вказує на необхідність додаткового обстеження хворого із залученням методів, що дають змогу виявити вірус чи його

Таблиця 4. Порівняльна оцінка інформативності імуноферментних тест-систем для виявлення IgM проти ВПГ на панелі РТН201 та контрольних зразках виробництва ВВІ

№ зразка панелі	DiaMedix		NovaTec		Gull IFA		Діапроф-Мед	
	HSV 1 ОП/ГЗ	HSV 2 ОП/ГЗ	HSV 1/2 ОП/ГЗ	HSV 1/2 ОП/ГЗ	HSV2 Titer	HSV 1/2 ОП/ГЗ	HSV 1/2 ОП/ГЗ	HSV 2 ОП/ГЗ
РТН201-01	0,7	0,3	0,2	0,2	<10	0,3	0,2	0,2
РТН201-02	0,1	0,3	0,2	0,2	<10	0,2	0,1	0,1
РТН201-03	0,6	3,8	0,1	7,2	80	7,2	6,9	6,9
РТН201-04	0,2	1,2	0,4	0,2	<10	0,2	0,1	0,1
РТН201-05	0,2	0,2	0,5	0,1	<10	0,1	0,2	0,2
РТН201-06	0,6	1,6	0,3	0,6	<10	0,6	0,1	0,1
РТН201-07	0,2	1,9	0,1	5,7	10	5,7	3,7	3,7
РТН201-08	0,3	0,6	0,2	0,3	<10	0,3	0,2	0,2
РТН201-09	0,3	0,2	0,1	0,2	<10	0,2	0,1	0,1
РТН201-10	0,1	0,2	0,4	0,5	<10	0,5	0,5	0,5
РТН201-11	0,3	0,8	0,2	0,5	<10	0,5	0,3	0,3
РТН201-12	0,3	1,0	0,1	0,2	<10	0,2	0,2	0,2
РТН201-13	0,4	1,7	0,4	1,9	20	1,9	1,1	1,1
РТН201-14	0,7	3,1	1,0	4,9	80	4,9	1,7	1,7
РТН201-15	0,1	0,4	0,4	0,1	<10	0,1	0,1	0,1
РТН201-16	0,5	1,8	0,3	1,2	40	1,2	0,3	0,3
РТН201-17	0,7	1,5	0,3	1,2	<10	1,2	0,2	0,2
РТН201-18	0,2	0,1	0,2	0,3	<10	0,3	0,1	0,1
РТН201-19	0,1	0,3	0,2	0,1	<10	0,1	0,1	0,1
РТН201-20	1,4	5,6	1,4	2,3	40	2,3	1,3	1,3
РТН201-21	0,2	0,1	0,1	0,2	<10	0,2	0,1	0,1
РТН201-22	0,3	1,9	0,4	5,4	40	5,4	3,5	3,5
РТН201-23	0,3	0,7	0,3	0,3	<10	0,3	0,2	0,2
РТН201-24	0,6	2,8	0,3	1,5	20	1,5	1,3	1,3
РТН201-25	0,1	0,6	0,1	0,1	<10	0,1	0,1	0,1
Accurap 800			0,2	0,3		0,3	0,1	0,1

сироваткою та гліцерином токсоплазми лішаються життєздатними протягом декількох діб [3].

Внаслідок життєдіяльності паразита, виділення антигенів та алергенів відбувається алергічна перебудова організму (за типом реакції гіперчутливості сповільненого типу) та синтезуються антитіла. Їх виявляють у різноманітних серологічних реакціях (РЗК, реакції Себіна-Фельдмана, ІФА тощо). У розвитку імунітету мають велике значення як клітинні, так і гуморальні фактори. Наявність антитіл захищає від нового зараження навіть високовірulentними штамми токсоплазм та обумовлює прихований перебіг токсоплазмозу в більшості інфікованих осіб. При ослабленні захисних сил організму та зниженні напруженості імунітету захворювання може загострюватись (відбувається перехід латентної форми в маніфестну). Загострення хронічного токсоплазмозу, як правило, провокується супутніми захворюваннями (такими, як грип, ГРЗ, пневмонія тощо) та може спостерігатися іноді через тривалий час (до 10-20 років) після інфікування.

Для діагностики токсоплазмозу важлива не сама тільки наявність позитивної відповіді в серологічних реакціях, а й оцінка титрів специфічних антитіл, їхня динаміка та імунологічний профіль. Нагадаємо, що при токсоплазмозі специфічні антитіла класу IgM у більшості випадків стають маркером активної реплікації токсоплазм. Вони з'являються на 2-му тижні інфікування, їхні титри зростають до 6-8-го тижня та поступово знижуються, але можуть залишатися на мінімальних рівнях протягом усього життя. Маркерами гострого токсоплазмозу служать також антитіла до токсоплазм класу IgA.

Специфічні антитіла класу IgG з'являються пізніше, досягають високої концентрації на 6-8-му тижні; далі високий рівень їх або зберігається роками, або знижується до мінімальних значень. Одноразове визначення навіть високих титрів антитіл класу IgG не можна вважати за доказ хвороби. Не слід забувати про можливість хибнопозитивних результатів ІФА в осіб з аутоімунною патологією, ревматоїдним поліартритом, вираженим пригніченням імунної системи [5].

В імунокомпетентних пацієнтів діагноз первинного інфікування (незалежно від наявності або відсутності клінічних проявів токсоплазмозу) підтверджують появою специфічних антитіл класів IgM та IgG або підвищенням більш як вдвічі титрів антитіл класу IgG

у сироватці крові, отриманої через 2-4 тижні після первинного обстеження. Діагноз загострення (реактивації) хронічного токсоплазмозу також підтверджують зростанням титрів специфічних антитіл класу IgG та появою антитіл класу IgM.

У випадку осіб з пригніченням імунної системи серологічні методи можуть бути неінформативними. Навіть при активній інфекції у частини таких людей не синтезуються специфічні антитіла класу IgM та недостатньо продукуються антитіла класу IgG. Тому при наявності типових клінічних ознак токсоплазмозу будь-який титр специфічних антитіл класу IgG у таких хворих може вказувати на ризик активної інфекції. Для підтвердження діагнозу в цих випадках можна використати паразитологічні методи, ПЛР, дослідження ліквору за допомогою ІФА [5].

У патогенезі хронічного та рецидивного токсоплазмозу велику роль відіграють вторинний імунodefіцит та аутоімунний процес з розвитком ауторегресивного синдрому. Останні можуть стати однією з причин невиношування вагітності.

Хронічна та латентна форма інфекції можуть активуватися у хворих з імуносупресією, що викликана хімотерапією, пересадкою органів, ВІЛ-інфекцією та різноманітними вірусними та онкологічними захворюваннями [11]. Так, токсоплазмоз посідає 2-3-є місце серед опортуністичних інфекцій у хворих на СНІД. У таких випадках хвороба набуває гострого злоякісного перебігу з розвитком некротичного локалізованого або дифузного менінгоенцефаліту; хвороба вражає очі та багато інших різних органів (серце, печінку, легені). На фоні розгорнутої картини СНІДу нашароване загострення (генералізація токсоплазмозу) може призводити до загибелі хворих [8].

Основна роль у розвитку токсоплазмозу в осіб з імуносупресією належить порушенням продукції цитокінів. Показано, що при розвитку токсоплазмозу на фоні ВІЛ-інфекції різко знижується як концентрація сироваткового гама-інтерферону, так і його здатність активувати макрофаги. До факторів захисту належать інтерлейкін-12 (ІЛ-12), ФНП, CD-8⁺; генералізації захворювання сприяють інтерлейкіни ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10.

У патогенезі клінічних форм хронічного токсоплазмозу основну роль відіграє розвиток реакцій гіперчутливості уповільненого типу до антигенів токсоплазм та продуктів їхньої життєдіяльності.

Результати порівняльного тестування набору сироваток РТН201 на тест-системах фірм Diamedix та Zeus наведено в таблиці 3 з паспортних даних до панелі; зразки 10 та 19 негативні. З представлених результатів видно, що показники інформативності тест-систем виробництва компанії «Діапроф-Мед» не розбігаються з показниками їхніх імпортерів аналогів.

Кількість даних тест-систем перевіряли на 177 позитивних зразках сироваток, взятих від громадян України; сироватки містили протигерпетичні антитіла класу IgG; всі ці сироватки було визначено як позитивні.

При порівняльній оцінці тест-систем «DIA-HSV1/2-IgM» та «DIA-HSV2-IgM» з їхніми імпортерними аналогами виробництва Diamedix та Nova Tes на наборі сироваток РТН201 усі зразки, що не містять антитіл класу IgM, визначено як негативні (табл. 4). За якісними характеристиками опрацьовані тест-системи не відстають від показників їхніх імпортерів аналогів, а за чутливістю переважають використовувану в Україні тест-систему фірми Nova Tes. Результати, отримані при дослідженні набору сироваток ВВІ на тест-системах виробництва «Діапроф-Мед», наближаються до результатів реакції імунофлуоресценції, представлених з паспортних даних.

При дослідженні в пропонованих тест-системах 47 зразків сироваток, що не містили антитіл проти ВПГ, хибно-позитивних результатів отримано не було.

При дослідженні в цих тест-системах 135 зразків сироваток крові вагітних не виявлено специфічних антитіл класу IgM до ВПГ1 та ВПГ2. Антитіла класу IgG до ВПГ2 знайдено у 20,7 % жінок; це не розбігається з епідеміологічними даними щодо поширеності ВПГ2 у країнах Європи (рис.1).

Таблиця 3. Показники інформативності тест-систем «DIA-HSV1/2-IgG» та «DIA-HSV2-IgG» на панелі „Anti-HSV type 1 and 2 Mixed Titer Performance Panel RTH201”

№ образца панели	Diamedix		Zeus		Діапроф-Мед	
	HSV 1 ОП/ГЗ	HSV 2 ОП/ГЗ	HSV 1 ОП/ГЗ	HSV 2 ОП/ГЗ	HSV 1/2 ОП/ГЗ	HSV 2 ОП/ГЗ
РТН201-01	3,5	1,6	1,3	0,6	2,2	1,8
РТН201-02	2,9	4,4	1,8	5,2	7,7	6,0
РТН201-03	1,0	1,1	0,3	0,6	0,5	1,0
РТН201-04	4,4	4,1	2,7	3,8	6,9	3,0
РТН201-05	4,0	2,2	1,6	0,8	3,8	2,1
РТН201-06	0,8	1,4	0,4	1,0	1,6	1,5
РТН201-07	0,9	1,2	0,3	0,5	0,6	1,2
РТН201-08	2,9	3,9	1,5	4,9	7,4	6,5
РТН201-09	4,6	3,4	2,7	3,9	7,8	5,0
РТН201-10	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
РТН201-11	3,8	2,7	1,5	1,5	3,3	2,0
РТН201-12	2,1	2,3	0,6	1,2	1,3	1,2
РТН201-13	2,4	3,3	1,2	3,2	5,4	4,5
РТН201-14	0,4	0,5	0,1	0,3	0,2	0,2
РТН201-15	4,7	3,6	2,2	2,2	6,3	5,5
РТН201-16	1,9	2,7	0,7	1,7	3,4	2,5
РТН201-17	4,6	5,6	2,4	5,9	8,9	7,2
РТН201-18	2,8	1,6	0,9	0,3	2,1	1,5
РТН201-19	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
РТН201-20	0,6	0,8	0,3	0,5	0,2	0,2
РТН201-21	3,3	2,2	1,7	0,8	4,2	3,6
РТН201-22	5,1	4,1	2,8	2,9	7,7	5,1
РТН201-23	4,3	2,2	1,8	0,7	4,6	1,3
РТН201-24	1,6	2,5	1,0	3,0	4,0	2,0
РТН201-25	5,1	3,7	2,6	2,2	7,0	3,5
Accurap 150					5,2	5,0
Accurap 800					0,1	0,1

Епідеміологія

Основним резервуаром і джерелом токсоплазм є представники родини котячих. Заражені кішки можуть протягом 1-3 тижнів виділяти з фекаліями ооцисти і розносити таким чином інфекцію, вносячи її збудника в довкілля [2].

До токсоплазмозу, крім людини, чутливі багато видів теплокровних тварин, серед них собаки, свині, коні, велика рогата худоба, вівці, кози, а також домашні та дикі птахи.

Основний механізм передачі збудника при токсоплазмозі людини – фекально-оральний. Зараження може відбуватися при вживанні в їжу ягід та горюдини, які росли на ділянках, забруднених фекаліями кішок, недостатньо провареного м'яса та субпродуктів від заражених тварин. Описано випадки інфікування через мікротравми шкіри (у працівників лабораторій, різників, мисливців тощо) [2].

Можлива вертикальна передача токсоплазми. Зараження жінок на ранніх стадіях вагітності у 40 % випадків призводить до трансплацентарної передачі збудника до плоду. Це може викликати загибель плоду, формування різних вад розвитку тощо. Є дані про зараження людини при трансплантаціях органів та тканин і переливанні крові.

Контакт з проміжними господарями (собаками, свійськими тваринами) до інфікування не призводить. Хвора людина не виділяє збудників у зовнішнє середовище та ніякої небезпеки для оточення не становить [2].

В залежності від способу зараження говорять про вроджений та набутий токсоплазмоз. У більшості випадків набутий токсоплазмоз протікає в латентній (прихованій) чи хронічній формі. Виявити інфікування можливо тільки лабораторними методами. Хронічному токсоплазмозу властиві тривалий субфібрилітет, генералізована лімфаденопатія; може спостерігатися загальна слабкість, погіршення апетиту, порушення сну, головний біль, біль у м'язах, суглобах. У окремих випадках у дорослих виникає погіршення зору: “туман перед очима”, біль в очах, світлобоязнь, поява жовто-білих висипань на очному дні. У 0,2-0,3 % хворих набутий токсоплазмоз протікає в гострій формі. У клінічній картині на перший план можуть виступати енцефалітичні та тифоподібні прояви. У першому випадку з'являються

ураження нервової системи (енцефаліт, менінгоенцефаліт, енцефаломієліт). Вони проявляються як лихоманка, сильний головний біль, судоми, блювота, галюцинації, паралічі черепних нервів, менінгеальні симптоми. У випадку одужання можуть залишитися стійкі порушення функції центральної нервової системи. Типової форма токсоплазмозу характеризується гострим спалахом, лихоманкою, появою висипань по всьому тілу (на 4-7-й день захворювання), збільшенням печінки та селезінки. Протікає вона тяжко, нерідко закінчується смертю [3, 11].

Вроджений токсоплазмоз. За час вагітності приблизно 1 % жінок інфікується токсоплазмами. Інфікування, як правило, носить безсимптомний характер. При первинному інфікуванні вагітної приблизно в 1/3 випадків відбувається інфікування плоду. Ризик інфікування плоду зростає зі збільшенням терміну вагітності, коли відбулося зараження жінки: для I триместру – 15 %, для II триместру – 30 %, для III триместру – 60 % [3, 6, 11].

Вроджений токсоплазмоз – це захворювання дітей, що виникає внаслідок зараження в період внутрішньоутробного розвитку. Зараження плоду від матері відбувається тільки у випадку первинного інфікування жінки у період даної вагітності; при паразитемії збудник може з кров'ю потрапити в плаценту. Там формується первинний осередок інфекції; звідки токсоплазми, теж через кров, потрапляють до плоду.

У жінок з хронічною чи латентною інфекцією, що заразилися токсоплазмозом до вагітності, передачі збудника до плоду не доведено, оскільки імунна система матері захищає плід від зараження. При обстеженні вагітних жінок первинна інфекція визначається за сероконверсією чи збільшенням титрів специфічних антитіл у 3-4 рази. Приблизно 30 % дітей, заражених внутрішньоутробно, мають при народженні клінічно виражений токсоплазмоз. У решті випадків йдеться про приховані форми вродженого токсоплазмозу, що, як правило, дають пізні клінічні прояви через місяці чи роки.

Ступінь вираженості клінічних проявів залежить від часу зараження плоду. Найтяжчі ураження ЦНС плоду спостерігаються при зараженні матері в I триместрі вагітності; вони зазвичай закінчуються викиднями. Зараження в пізніші терміни призводить до народження дитини з уродженою формою токсоплазмозу, що характеризується фізичною та розумовою неповноцінністю (енцефаліти з ураженнями

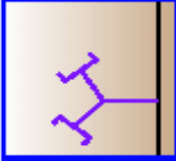
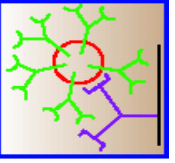
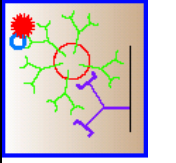
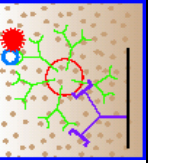
Характеристика показників якості імунферментних тест-систем для діагностики герпетичної інфекції

Для вивчення показників якості даних тест-систем брали сироватки крові, охарактеризовані в аналогічних імпорتنих імунферментних тест-системах, а також комерційні контрольні зразки та набори сироваток:

- панель сироваток, що містять антитіла до ВПГ 1 та ВПГ 2 у різних титрах – Anti-HSV type 1 and 2 Mixed Titer Performance Panel РТН201 виробництва ВВІ (США);
- позитивний контрольний зразок, який містить антитіла класу IgG до ВПГ – Accugen 150 HSV IgG Positive Control (ВВІ, США);
- негативний контрольний зразок, що не містить антитіл проти збудників групи TORCH – Accugen 800 TORCH Negative Control (ВВІ, США).

При аналізі контрольних зразків у тест-системах «DIA-HSV1/2-IgG» та «DIA-HSV2-IgG» отримано позитивний результат з позитивним контролем (Accugen 150) та негативний результат – з негативним контролем зразком (Accugen 800), який не містить антитіл проти збудників групи TORCH. У таблиці 3 подано результати, отримані при роботі на тест-системах НВК «Діапроф-Мед» у порівнянні з тест-системами „Diamedix” і “Zeus” (паспорні дані до панелі ВВІ).

Схема проведення ІФА
для тест-систем «DIA-HSV ½-IgM» та «DIA-HSV2-IgM»

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи сенситивізовані моноклональними антитілами до IgM людини	
- Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розчину для розведення зразків та по 10 мкл зразків контролю та сироваток - Інкубація 60 хв при 37 °C - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки розчину кон'югату - Інкубація 30 хв при 37 °C - Формування комплексу з кон'югатом - Промивання лунок буферним розчином (6 разів)	
- Внесення в лунки розчину проявника - Інкубація 30 хв (забарвлення) - Зупинення реакції - Реєстрація оптичної густини	

III, IV, VI, VII пар черепно-мозкових нервів, паралічі та парези, нейрохоріоретиніт з наступним виникненням сліпоти) [2, 10].

При зараженні плоду наприкінці вагітності чи під час пологів можливий розвиток гострого токсоплазмозу у новонародженого. При цьому реєструють загальний інтоксикаційний синдром, який проявляється лихоманкою, збудливістю, генералізованою лімфаденопатією, анорексією, різними висипаннями на шкірі, включаючи й геморагічні (за рахунок ураження судин), гепатолісальним синдромом (тяжкий вроджений паренхіматозний гепатит з печінково-клітинною недостатністю), ураженням серцево-судинної системи. Захворювання може прогресувати та закінчуватися через декілька тижнів загибеллю дитини чи перейти в хронічну форму, що характеризується затримкою розвитку дитини, передусім психічного, з можливим виникненням хоріоретиніту [2, 4, 8].

Лабораторна діагностика токсоплазмозу

Значне розмаїття клінічних проявів при токсоплазмозі та різноманітний характер перебігу хвороби практично виключають можливість встановлення діагнозу тільки на основі клінічної картини, у зв'язку з чим зростає роль лабораторних досліджень (табл.1).

Лабораторні методи дослідження токсоплазмозу базуються на паразитологічних та імунологічних дослідженнях [7]. Паразитологічними методами виявляють збудника при мікроскопії гістологічних зрізів внутрішніх органів чи після зараження чутливих лабораторних тварин матеріалами від хворих.

Для прямої мікроскопії готують мазки та відбитки з пунктуату чи біоптованих частинок лімфатичних вузлів, кісткового мозку, мигдаликів, із центрифугату спинномозкової рідини та крові; беруть також мазки та гістологічні зрізи зі шматочків органів трупа (його головного мозку, печінки, селезінки). При патології вагітності досліджують плаценту, плідні оболонки, амніотичну рідину, а також зіскоби з порожнини матки, органи абортowanego плоду та мертвонароджених дітей.

Таблиця 1. Методи діагностики токсоплазмозу

Паразитологічний метод	Складний у виконанні, потребує особливого режиму роботи для запобігання лабораторного зараження, рідко виявляє токсоплазми в тканинах.
РФК, РНГА, РНІФ	Малоінформативні, бо не дають змоги судити про активність процесу.
ІФА	Найбільш достовірний, високочутливий та специфічний метод, що дає змогу не тільки виявити специфічні антитіла різних класів, але і визначити їх концентрацію.
ПЛР	Для діагностики внутрішньоутробного інфікування плоду застосувати метод ПЛР не завжди бажано через можливе ушкодження плоду при амніоцентезі. У хворих на СНІД результати ПЛР мають вирішальне значення для підтвердження викликаного токсоплазмами енцефаліту, якщо результати ІФА малоінформативні.
Алергологічний метод – внутрішньокірвна проба з токсоплазмінном	Тепер не використовується.

Виділення збудника проводять методом біопроб; для цього найчастіше використовують білих мишей, бо в них, на відміну від морських свинок, кролів та інших тварин, рідко трапляється спонтанний токсоплазмоз. Але застосування паразитологічних методів діагностики токсоплазмозу обмежене, тому що воно вимагає великих затрат праці, необхідності особливих лабораторних умов при роботі з живим збудником. Негативні результати прямої мікроскопії та біопроби не становлять абсолютного доказу, бо не виключають токсоплазменної інфекції.

У більшості випадків при діагностиці токсоплазмозу орієнтуються на наявність у сироватці крові специфічних антитіл, які визначаються імунологічними методами; це реакція з барвником

Тест-системи «**DIA-HSV1/2-IgM**» та «**DIA-HSV2-IgM**» призначені для визначення антитіл класу IgM у сироватках і плазмі крові. Діагностикуми створені за принципом IgM-пастки, коли на тверду фазу – лунки полістиролових планшетів – сорбують антивидові МКАТ проти IgM людини.

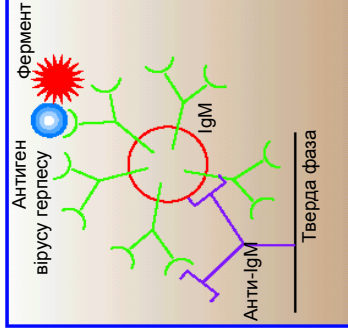


Рис. 6. Принципова схема визначення специфічних антитіл класу IgM на тест-системах «DIA-HSV1/2-IgM» та «DIA-HSV2-IgM»

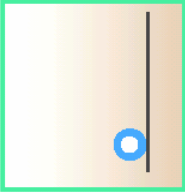
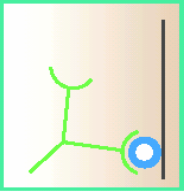
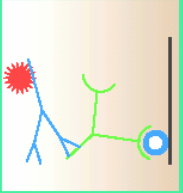
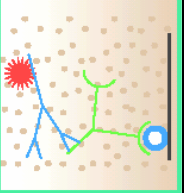
У тест-системі «**DIA-HSV1/2-IgM**» у складі кон'югату використано рекомбінантні білки G1 і G2, а в тест-системі «**DIA-HSV2-IgM**» – самий лише білок G2, мічені пероксидазою хрому.

При внесенні в лунки планшета досліджуваних проб сироваток антитіла класу IgM приєднуються до противидових МКАТ на твердій фазі. Специфічні антитіла в утворених імунних комплексах виявляють за допомогою пероксидазного кон'югату, який містить рекомбінантні білки ВІП. Після відмивання незв'язаних компонентів до проб у лунки планшета додають розчин проявника, що містить перекис водню (субстрат пероксидази) та хромоген (тетраметилбензидин). Ферментативну реакцію зупиняють, додавши стоп-реагент (0,5 M розчин сірчаної кислоти), та вимірюють оптичну густину суміші в пробах; при довжині хвилі 450 нм вона пропорційна концентрації специфічних антитіл у пробах сироваток чи плазми крові.

пробах; при довжині хвилі 450 нм вона пропорційна концентрації специфічних антитіл у пробах сироваток чи плазми крові.

Схема проведення ІФА на тест-системах «DIA-HSV1/2-IgG» та «DIA-HSV2-IgG

Етапи проведення аналізу

Процедури	Формування комплексу
Полістиролові стрипи сенсibiliзовані антигенами вірусу простого герпесу 1 і 2 типів	
- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розведених 1:51 зразків контролів і досліджуваних сироваток - Інкубація 60 хв при 37 °C – формування комплексу АГ-АТ - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки розчину кон'югату - Інкубація 30 хв при 37 °C (формування комплексу з кон'югатом) - Промивання лунок буферним розчином (6 разів)	
- Внесення в лунки розчину проявника - Інкубація 30 хв (забарвлення) - Зупинення реакції - Ресстрація оптичної густини	

Себіна-Фельдмана (РБ), реакція зв'язування комплекменту (РЗК), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), реакція непрямой імунофлуоресценції (РНІФ) та імуноферментний аналіз (ІФА) [5-7]. Сьогодні імуноферментний метод діагностики має провідне значення у медичній та лабораторній практиці.

При первинному інфікуванні токсоплазмами антитіла класу IgM з'являються через 1-2 тижні від моменту інфікування та визначаються протягом кількох тижнів. Антитіла класу IgG з'являються у крові через 1-2 місяці після інфікування і зберігаються протягом багатьох років. Рецидив захворювання при хронічній чи латентній інфекції, як правило, не дає значного підвищення титру антитіл класу IgM, організм відразу реагує збільшенням титру антитіл класу IgG. Таким чином, виявлення специфічних антитіл класу IgM у досліджуваних осіб є показником первинного інфікування. Відомо, що в процесі імунної відповіді при первинній інфекції IgG антитіла мають низьку константу зв'язування з антигеном. При подальшому протіканні інфекційного процесу авідність IgG зростає. Але повторна токсоплазменна інфекція також може викликати синтез IgM антитіл, що іноді ускладнює диференційну діагностику первинної та повторної інфекції. Тому для виявлення первинної інфекції доцільно визначати показник авідності специфічних антитіл класу IgG у сироватці крові.

Діагностика токсоплазмозу у вагітних

Згідно з рекомендаціями ВООЗ, первинне обстеження вагітних на токсоплазмоз починається з визначення специфічних антитіл класу IgG. Жінки дітородного віку з негативними результатами серологічних досліджень повинні бути віднесені до групи ризику та підлягають обов'язковому обстеженню 1 раз в триместр, тому що вони можуть інфікуватися під час вагітності [5].

Таблиця 2 Діагностика токсоплазмозу у вагітних: стратегія моніторингу – первинне тестування (рекомендації ВООЗ)

Варіанти	Результат визначення (МО/мл)		Інтерпретація	Рекомендації
	IgG	IgM		
A	Негативний <6	Негативний	Імунітет відсутній (група ризику)	При вагітності досліджувати кров кожні 4 тижні
B1	Позитивний 6<ME<200	Негативний	Захисний імунітет (після хвороби)	Повторне дослідження через 2-3 тижні для підтвердження захисного імунітету
B2	Позитивний >200	Негативний	Підозра на серо-конверсію	Повторне дослідження сироватки через 2-3 тижні на IgM, IgA антитіла
B3	Позитивний >6	Позитивний		Повторне дослідження сироватки через 2-3 тижні
C	Негативний <6	Позитивний		Повторне дослідження крові через 2-3 тижні

системи. 2 з них призначено для виявлення антитіл класів IgG та IgM до ВПГ 1 та 2 типів, а 2 – саме для визначення цих антитіл до ВПГ2.

Тест-системи «*DIA-HSV1/2-IgG*» і «*DIA-HSV2- IgG*» створено за принципом непрямого ІФА; вони призначені для перевірки сироваток крові людини на наявність антитіл класу IgG проти вірусу простого герпесу.

За допомогою тест-системи «*DIA-HSV1/2-IgG*» визначають антитіла проти обох типів ВПГ. У складі імуносорбенту використано антигени вірусних лізатів.

Тест-система «*DIA-HSV2-IgG*» призначена для виявлення антитіл проти ВПГ2. У складі імуносорбенту використано рекомбінантний антиген G2.

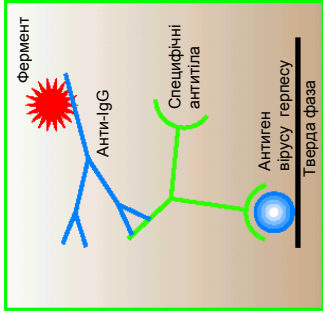


Рис. 5. Принципова схема визначення специфічних антитіл класу IgG з тест-системами «DIA-HSV1/2-IgG» та «DIA-HSV2-IgG»

При внесенні в лунки планшетів (стрипів) досліджуваних проб сироваток специфічні антитіла до ВПГ зв’язуються з антигенами твердої фази (імуносорбенту), утворюючи комплекси антиген-антитіло.

Утворені комплекси виявляють за допомогою пероксидазного кон’югату, який містить моноклональні антитіла проти людських імуноглобулінів класу IgG.

Після відмивання неприсъєднаних компонентів у лунки планшетів вносять розчин проявника, що містить перекис водню (субстрат пероксидази) та хромоген (тетраметилбензидин).

Ферментативну реакцію зупиняють, додавши стоп-реагент (0,5 М розчин сірчаної кислоти), та вимірюють оптичну густину суміші в

дуже поширену раніше в лабораторній практиці для цієї мети. ІФА зручний для практичного застосування, не вимагає значних затрат часу та вартісного обладнання; він дає змогу одночасно дослідити велику кількість проб без попередньої підготовки їх до аналізу.

При серодіагностиці ВПГ найчастіше використовують метод твердофазного ІФА з різноманітними конструкціями та схемами проведення реакції. Звичайно продажні діагностичні тест-системи створюються за принципом непрямого варіанта ІФА та ІgM-«пастки».

У непрямому варіанті ІФА в складі імуносорбенту використовують антигени ВПГ, а в кон'югаті – мічені ферментом противидові антитіла. В ІФА типу «пастки» до складу імуносорбенту входять моноклональні антитіла (МКАТ) проти імуноглобулінів людини, а до складу кон'югату – антигени ВПГ, мічені ферментом.

При отриманні імуносорбентів використовують або високоочищені лізати ВПГ1 та ВПГ2, або рекомбінантні білки-аналоги оболонкових білків даних вірусних серотипів.

Єдині типоспецифічні білки, що мають діагностичне значення та розташовані на поверхні часточок ВПГ1 та ВПГ2, – це gG-1 та gG-2, відповідно [18]. Цими білками користуються в ІФА для виявлення ІgM та ІgG при диференційній діагностиці ВПГ1 та ВПГ2. За допомогою цих типоспецифічних білків досягнуто досить високих показників чутливості та специфічності ІФА при визначенні ВПГ; вони складають 95 % та 97 %, відповідно [14]. Встановлено, що серологічний статус хворих, заражених ВПГ2, з часом змінюється; у інфікованих осіб не вдається виявляти антитіл проти пептиду gG-2 [16]. В результаті проведення наукових досліджень показано, що такі антитіла можна «виловити», якщо вносити до складу імуносорбента не повний глікопротеїн gG-2, а лише його частину, представлену олігопептидом p55 [19]. До складу цього пептиду входить 18 амінокислотних залишків gG-2, чотири гліцинових зшивки поміж ними та лізинова серцевинна ділянка. Така заміна значно підвищує чутливість ІФА; при використанні p55 чутливість та специфічність виявлення ВПГ2 зростають та становлять 100 % та 98,4 %, відповідно.

**Імуноферментні тест-системи виробництва
НВК „Діапроф-Мед”**

Для серологічної діагностики ІПГ компанією «Діапроф-Мед» розроблено та випускаються 4 діагностичних імуноферментних тест-

Таблиця 3. Діагностика токсоплазмозу у вагітних: стратегія моніторингу – повторне тестування (рекомендації ВООЗ)

Варіанти	Результат визначення		Інтерпретація	Рекомендації
	IgG (МО/мл)	IgM		
Ва	Позитивний (збільшення концентрації в 2 та більше разів)	Позитивний	Сероконверсія	Доцільно підтвердити в інших тест-системах, а також визначити присутність ІgA
Вb	Позитивний (без зміни концентрації)	Позитивний	Захисний імунітет (після перенесеної хвороби більш як 2 місяці тому)	Доцільно дослідити через 2-3 тижні з метою підтвердження захисного імунітету
Са	Позитивний > 6	Позитивний	Сероконверсія	Доцільно підтвердити в інших тест-системах, а також визначити присутність ІgA
Сb	Негативний < 6	Позитивний	Імунітет відсутній (група ризику)	При вагітності досліджувати кров що 4 тижні (неспецифічні антитіла)

У випадку виявлення у вагітних антитіл класу IgG у діапазоні 6-200 МО/мл без встановлення їх чіткого наростання, при відсутності антитіл класу IgM та клінічної симптоматики, жінки вважаються практично здоровими та надалі обстежуються тільки при появі відповідних скарг.

Результати визначення специфічних антитіл класу IgG на рівні 200 МО/мл та вище можуть свідчити про загострення хронічного токсоплазмозу чи про гострий токсоплазмоз. Щоб підтвердити або виключити активність процесу, слід провести дослідження для визначення маркерів гострої фази – специфічних антитіл класів IgM та IgA. Сероконверсія (поява антитіл проти токсоплазм класів IgG та IgM), а також/або зростання титру антитіл класу IgG в динаміці вдвічі та більше дають змогу діагностувати гострий токсоплазмоз чи реактивацію хронічного токсоплазмозу у вагітної [5].

Групи осіб, що підлягають обстеженню на токсоплазмоз

Жінки, що планують вагітність, а також вагітні, з метою виявлення групи ризику. Група ризику – це жінки, не інфіковані токсоплазмами, та ті, які не мають до них антитіл (серонегативні). Уроджений токсоплазмоз загрожує дітям, народженим матерями тільки цієї групи. Лабораторне дослідження полягає у визначенні рівня специфічного IgG у сироватці крові. При негативному результаті жінка належить до групи ризику. Якщо припускають, що зараження трапилося протягом останніх двох місяців, то бажано також визначити рівень IgM. При наявності IgM рекомендують відкласти дату запліднення на 2-3 місяці. Питання про лікування вирішується, виходячи з клінічних проявів у зараженої жінки. Тим, у кого виявлено позитивний титр IgG та негативний IgM, можна рекомендувати запліднення; для них токсоплазмоз не становить небезпеки під час вагітності.

Вагітні з групи ризику. Протягом вагітності рекомендують 1 раз на три місяці визначати рівень специфічних антитіл класів IgM та IgG у вагітних з групи ризику [1]. У випадку позитивних результатів одного чи обох аналізів необхідно провести оцінку ризику інфікування плоду та відповідно вирішувати питання про переривання вагітності чи про лікування.

ускладнень під час вагітності та підвищує можливість сприятливішого прогнозу для плоду та для новонародженого немовляти.

Перед пологамі слід перевірити наявність ВПГ у родових шляхах (дослідження зішкрябів методом ПЛР) та рецидиву інфекції (серодіагностика специфічних антитіл класів IgM та IgG проти ВПГ методом ІФА). При позитивній відповіді ставиться питання про розродження шляхом кесаревого розтину.

- Жінки з цервіцитами, уретритами, циститами, проктитами, що стійкі проти лікування антибактерійними препаратами

У даної групи хворих необхідно провести комбіноване обстеження на присутність ВПГ, взявши зішкряби з уражених областей та сечу при циститі й уретриті (для дослідження методом РІФ або ПЛР); таким чином виявляють нетипові та безсимптомні форми інфекції.

- Новонароджені з ознаками неонатального герпесу

У патогенезі неонатального герпесу відіграють роль два серотипи вірусу – ВПГ1 та ВПГ2. Проте тяжке генералізоване захворювання з високим рівнем летальності найчастіше спричиняється ВПГ2. Тому показанням для діагностики неонатального герпесу стає генералізована інфекція незрозумілої етіології, при якій не дає добрих результатів цілеспрямована антибактеріальна терапія. Щоб перевірити присутність ВПГ, досліджують кров при дисемінованій інфекції і спинномозкову рідину при ознаках ушкодження ЦНС; беруть також зішкряби з уражених ділянок. Одночасно проводять диференційне серологічне дослідження для визначення антитіл класів IgM та IgG проти ВПГ1 та ВПГ2.

Імуноферментний аналіз у серодіагностиці простого герпесу

При підозрі на герпетичну інфекцію негативний результат, отриманий при вірусологічному дослідженні та спробі виявити вірусні антигени, має бути підтверджений відсутністю в крові пацієнта специфічних антитіл до ВПГ, бо захворювання, як уже зазначалось, може перебігати нетипово чи безсимптомно. Тому при постановці діагнозу ПГ слід обов'язково проводити серологічні дослідження.

ІФА набуває все більшого значення для діагностики герпетичної інфекції при визначенні специфічних антитіл проти збудника; на сьогодні ІФА майже повністю витіснив реакцію фіксації комплекта,

диференційній діагностиці протигерпетичних IgG до ВПГ1 та ВПГ2 у сироватці крові, бо найгірший прогноз для новонародженого – виявлення саме ВПГ2. Якщо обстеження проводиться під час планування вагітності, то необхідно також визначити наявність протигерпетичних антитіл класу IgM. Їхня присутність свідчить про активну стадію інфекції ПГ, а тому рекомендують відкласти дату зачаття, а при необхідності провести курс протівірусної терапії.

• Вагітні з групи ризику з підозрою на інфекцію ПГ

При підозрі на первинну герпетичну інфекцію у вагітної жінки проводять лабораторне обстеження на ВПГ – аналіз матеріалу зішкрябів методом ПЛР та обстеження крові на протигерпетичні антитіла класів IgM та IgG методом ІФА. У випадку позитивної відповіді вагітна жінка повинна бути під наглядом лікаря. Перед пологами слід провести повторні аналізи, щоб переконатися у відсутності рецидиву хвороби. При наявності активного вірусу в цервікальному каналі ставиться питання про розродження шляхом кесаревого розтину. Обрив вагітності при первинній герпетичній інфекції в матері не показаний, бо дитина інфікується ВПГ, головним чином, інтранатально (під час пологів).

• Вагітні жінки з групи ризику передпологами

Оскільки герпетична інфекція може перебігати нетипово та безсимптомно, жінок групи ризику слід перед пологами обстежити на наявність ВПГ – проводиться аналіз зішкрябів методом ПЛР та обстеження крові на протигерпетичні антитіла класів IgM та IgG до ВПГ1 та ВПГ2 методом ІФА. При позитивній відповіді ставиться питання про розродження шляхом кесаревого розтину.

Перед пологами слід обстежувати вагітних жінок з ознаками генітального герпесу та їхніх статевих партнерів.

Завершення вагітності при хронічному генітальному герпесі багато в чому залежить від своєчасної діагностики та відповідного лікування. Загострення хвороби у I та II триместрах вагітності супроводиться внутрішньоутробною гіпоксією плоду та часто призводить до викиднів. Рецидиви інфекції у III триместрі викликають зміни в плаценті, що сприяють розвитку інфекційних захворювань у новонароджених. Визначення рівнів специфічних антитіл класів IgM та IgG проти ВПГ дає змогу попередити рецидиви захворювання та своєчасно провести поетапну реабілітацію; це знижує кількість

Вагітні з ознаками зараження токсоплазмозом. При обстеженні вагітної з ознаками токсоплазмозу (субфібрилітет, лімфаденопатія, болі у м'язах тощо) у першу чергу необхідно з'ясувати, чи були в обстежуваної прояви токсоплазмозу до вагітності. Якщо жінка ще до вагітності заразилася токсоплазмами та мала ознаки інфекції, важливо виключити імунодефіцитні захворювання (передусім СНІД). Якщо лікареві доводиться мати справу з жінкою, що раніше не обстежувалася на токсоплазмоз, перед лікарем постають два завдання: по-перше, необхідно встановити, чи ця вагітна інфікована токсоплазмами та, у випадку позитивної відповіді на перше питання, визначити, коли могло статися зараження – до вагітності чи під час даної вагітності. Вирішальну відповідь на це питання дають визначення специфічних антитіл класів IgM та IgG у динаміці.

Новонароджені з ознаками вродженого токсоплазмозу. При підозрі на зараження токсоплазмозом у новонародженого необхідно дослідити рівень антитіл класу IgM у сироватці крові немовляти. У випадку гострої інфекції результат аналізу позитивний. Діагноз можна підтвердити, якщо в крові матері також виявлено антитіла цього класу. При хронічній та латентній формах інфекції в немовляти в тих випадках, коли інфікування відбулося у I чи II триместрі вагітності, антитіла класу IgM можуть не виявлятися. Тоді про наявність інфікування можна судити з динаміки антитіл класу IgG; при цьому також необхідно досліджувати їхній рівень у крові матері. При наявності інфікування він у перші місяці життя немовляти зростає. Якщо дитина не заражена, то в її крові або не виявляють антитіл класу IgG (мати серонегативна), або рівень їх зменшується (через розпад материнських антитіл) [6]. У деяких випадках для підтвердження діагнозу використовують методи для виявлення токсоплазм у біоптатах, лікворі, крові (культуральний метод, ПЛР тощо).

Імунофермента діагностика токсоплазмозу

Компанія “Діапроф-Мед” серійно випускає тест-системи для діагностики токсоплазмозу на основі ІФА.

Імуноферментні тест-системи

- **«DIA-Toxo-IgG»** – тест-система імуноферментна для кількісного визначення антитіл класу IgG до збудника токсоплазмозу людини (Toxoplasma gondii).
- **«DIA-Toxo-IgM»** – тест-система імуноферментна для визначення антитіл класу IgM до збудника токсоплазмозу людини (Toxoplasma gondii).

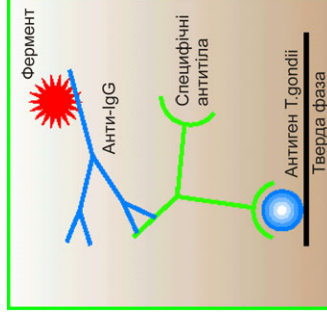


Рис. 1. Принцип аналізу для визначення антитіл класу IgG, специфічних до T.gondii

Основні компоненти набору – імуносорбент та імуноферментний кон’югат. Імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані антигеном T.gondii. Кон’югат – моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу IgG, кон’юговані з пероксидазою хрому. При внесенні в лунки планшета зразків досліджуваних сироваток антитіла, специфічні до токсоплазми, зв’язуються з антигеном на твердій фазі, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Утворені комплекси виявляють за допомогою кон’югату. Після відмивання незв’язаних компонентів у лунки додають розчин проявника – субстрату пероксидази (перекис водню) та хромогену

ДНК-полімерази Таq і специфічних затравок, так званих праймерів [13]. Новосинтезовані фрагменти ДНК стають матрицями для синтезу нових ланцюгів у наступному циклі ампліфікації. Утворюваний продукт реакції – амплікон визначають за допомогою електрофорезу чи якимось іншим чином, якщо використовуються затравки чи зонди, мічені флуорохромом або ферментом. Метод високоспецифічний і дуже чутливий. Він усе ширше застосовується для підтвердження діагнозу ПП.

Виходячи з виникнення різнопланових порушень імунітету в хворих на ПП, необхідно, оцінюючи імунний статус таких хворих, визначати у них напруженість як клітинного, так і гуморального імунітету. Діагностичне значення при ПП мають такі показники, як інтерферогенна активність Т-лейкоцитів, рівні різних субпопуляцій Т-клітин, їхня здатність синтезувати інтерлейкіни (ІЛ-2, ІЛ-4 та ІЛ-6), а також рівні специфічних антитіл. При первинній інфекції діагностичне значення має виявлення IgM та/або чотирихкратне підвищення рівнів специфічних антитіл класу IgG у парних сироватках, взятих у хворого з інтервалом 10-12 днів. Імуноглобуліни класу IgM визначають на 4-20-й день після зараження; дещо пізніше – з 10-14-го дня – виявляють специфічні антитіла класу IgG [2]. Рецидивний герпес розвивається звичайно на фоні достатньо високих рівнів антитіл класу IgG, що свідчить про постійну стимуляцію імунної системи хворого. Поява антитіл класу IgM в особи, інфікованої ВПГ, свідчить про загострення хвороби. Наявність протигерпетичних IgG у низьких титрах не доводить відсутності активної герпетичної інфекції [7]. При виявленні специфічних антитіл класу IgG у титрах, вищих за середні рівні цих антитіл, слід додатково обстежити хворого, щоб підтвердити чи заперечити діагноз ПП [2].

Групи осіб, яких слід обстежувати на наявність герпетичної інфекції - це:

- Жінки без ознак ПП, які планують вагітність, та вагітні, з метою виявлення групи ризику, яка найбільш чутлива до ураження ВПГ. До групи ризику належать жінки, які не інфіковані ВПГ та не мають антитіл проти нього, оскільки внаслідок зараження серонегативної жінки під час вагітності виникає максимальний ризик інфікування новонародженого. Лабораторне дослідження полягає у

Для виявлення антигенів ВІП в інфікованому матеріалі використовують реакцію імунофлуоресценції, метод гібридизації нуклеїнових кислот та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР).

При лабораторній діагностиці ПГ застосовують два варіанти РІФ – прямий та непрямий. У першому випадку протигівірсує антитіла, мічені барвником, наносять на інфіковані клітини (мазок, культура клітин). У непрямому варіанті РІФ на досліджуваній матеріал наносять немічену специфічну сироватку, антитіла якої приєднують вірусний антиген; потім додають так звану протигівірсову сироватку, мічену флуорохромом. Застосування РІФ для виявлення вірусу в клінічному матеріалі можливе лише в тому випадку, коли там присутня достатньо велика кількість інфікованих клітин і немає значного забруднення мікроорганізмами, які можуть давати неспецифічне світчення [5].

Імуноферментний метод визначення вірусних антигенів в основі своїй подібний до РІФ, але використовувані тут антитіла мітяться не барвником, а ферментом, найчастіше – пероксидазою хрому чи лужною фосфатазою. Мічені антитіла приєднуються до антигену, і такий комплекс виявляють після додавання проявника, який містить субстрат для кон'югованого ферменту та хромоген. Оскільки за допомогою ІФА можна кількісно визначати розчинні антигени, метод не потребує присутності інтактних клітин у зразку. Кількісний підхід при виявленні антигенів чи антитіл – це важлива перевага ІФА; тому його можна використовувати для оцінки клінічного перебігу хвороби та дієвості здійснюваного лікування [11]. Як і РІФ, ІФА можна застосовувати як у прямому, так і в непрямому варіанті.

В основі методів молекулярної гібридизації нуклеїнових кислот лежить виявлення вірусної ДНК за допомогою комплементарних до неї РНК-зондів, мічених, наприклад, біотином; іноді зонди містять молекули-передавачі енергії (FRET, fluorescent resonance energy transfer) чи конюгат пептиду з нуклеїновою кислотою (PNA, peptide nucleic acid) [7]. Опрацьовано декілька модифікацій методу – точкова гібридизація (досліджувану денатуровану ДНК наносять на нітроцелюлозний фільтр та додають мічений зонд), блот-гібридизація (на фільтри наносять тільки фрагменти ДНК, оброблених нуклеазами) та гібридизація *in situ* (виявлення ДНК безпосередньо у клітинах).

ПЛР базується на багаторазовому повторенні циклів синтезу (ампліфікації) ДНК чи її фрагментів за допомогою термостабільної

(3,3',5,5'-тетраметилбензидин – ТМБ). Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, та вимірюють оптичну густину суміші в лунках; при довжині хвилі 450 нм оптична густина проби пропорційна концентрації специфічних антитіл у зразках сироваток чи плазми крові. Тест-набір дає змогу проводити кількісну оцінку концентрації специфічних до токсоплазми імуноглобулінів; її виражають у міжнародних одиницях на 1 мл, як у більшості комерційних тест-систем. Концентрацію специфічних антитіл класу IgG у калібрувальних зразках стандартизовано за 3-м Міжнародним стандартом анти-токсоплазми.

Тест-систему для виявлення специфічних антитіл класу IgM – «DIA-Toxo-IgM» – сконструйовано за принципом IgM-«пастка»: антитіла класу IgM, присутні у сироватці, зв'язуються з сорбованими моноклональними антитілами до μ -ланцюга IgM, а специфічні серед них виявляються антигеном, що кон'югований з ферментом.

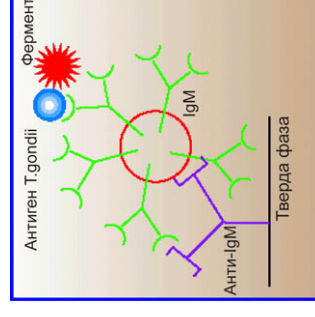


Рис. 2. Принцип аналізу для визначення антитіл класу IgM, специфічних до T.gondii

Слід відзначити, що у цій схемі визначення специфічних антитіл, присутніх у сироватці, антитіла класу IgG не конкурують за місця зв'язування зі специфічним антигеном; відсутня також і неспецифічна реактивність, що спостерігається у випадку використання непрямого ІФА та обумовлена наявністю в деяких сироватках ревматоїдного фактора.

При проведенні лабораторних досліджень необхідно вирішити питання про вибір тест-системи. За сучасними уявленнями, для оцінки якості та придатності тест-системи використовують наукові, медичні та економічні критерії. Наукові критерії вибору методу включають визначення чутливості, специфічності та відтворюваності діагностикумів.

Чутливість – показник, що характеризує здатність тест-системи виявляти максимальну кількість істинно позитивних сироваток, відображає долю інфікованих осіб, які можуть бути виявлені при використанні даної тест-системи. Чутливість визначається за формулою:

$$Чутливість = \frac{П}{П + ХН} \times 100 \%,$$

де П - кількість позитивних результатів аналізу, ХН – кількість хибно-негативних результатів аналізу.

Специфічність – здатність тест-системи визначати лише той компонент, для визначення якого вона призначена, тобто показник, що характеризує здатність діагностикума реєструвати мінімальну долю хибнопозитивних результатів. Специфічність визначається за формулою:

$$Специфічність = \frac{Н}{Н + ХП} \times 100 \%,$$

де Н – кількість негативних результатів аналізу, ХП – кількість хибнопозитивних результатів аналізу.

Таким чином, більш чутливою буде та тест-система, яка дає меншу кількість хибнонегативних результатів, а більш специфічною – та, що дає меншу кількість хибнопозитивних результатів.

Згідно з рекомендаціями BOO3, CDC (USA, Centers for Disease Control and Prevention), FDA (USA, Food and Drug Administration), чутливість та специфічність визначається на підставі результатів, отриманих при тестуванні позитивних чи негативних сироваток

Таблиця 2. Методи діагностики ПП

Метод діагностики:	Час, потрібний для роботи	Примітка
Цитологічний	2-3 год	малоспецифічний
вірусологічний: - виділення вірусу з клінічного матеріалу та його ідентифікація у культурі клітин	2-5 днів	повільний
виявлення антигенів ВПГ за допомогою: реакції імунофлуоресценції (РІФ); гібридизації нуклеїнових кислот полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	1-2 год 2-4 год	малодоступний високозатратний, трудомісткий
Імунологічний: - оцінка імунного статусу хворого	2-3 дні	необхідні показники – ПКК, альфа- та гама-ІФН, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6
Серологічний: - виявлення специфічних антитіл за допомогою ІФА	1-2 год	швидкий, простий

Виділення та ідентифікацію ВПГ на культурі чутливих клітин проводять звичайно на початку захворювання, коли вірус виходить з клітин у відносно великих кількостях та ще не зв'язаний з антитілами [7]. Щоб зменшити при цьому ймовірність хибно-негативного результату, особливо при безсимптомних формах герпесу, треба досліджувати якомога більшу кількість проб від одного хворого (виділення з уретри, вагіни, шийки матки, ампули прямої кишки, сперму, сечу тощо), бо ВПГ виявляють, як правило, лише у 1-2 пробах з 2-4 досліджених проб біоматеріалів, отриманих від хворого. У жінок частота виявлення ВПГ дуже залежить від фази менструального циклу; частіше збудника виявляють на початку лютеїнової фази [11].

Відмічено високу частоту передачі ВПГ від інфікованої матері до дитини при народженні та через декілька днів після народження. Не виключений і повітряно-крапельний шлях передачі інфекції. У зараженої людини триває пожиттєве переживання ВПГ. Періодично спостерігаються рецидиви хвороби – від субклінічних до тяжких форм. Особливо важко перебігають рецидиви хвороби в осіб з імунodefіцитними станами. ВПГ вважається за маркер імунodefіциту будь-якого походження; ВПГ2 може стати причиною злоякісної трансформації клітин.

Лабораторна діагностика

Розмаїття клінічних проявів ПГ, наявність нетипових, субклінічних та безсимптомних форм хвороби, залучення до інфекційного процесу багатьох систем хазяїна часто спричиняють труднощі при діагностиці цього захворювання. Постановці діагнозу при ПГ додатково заважає ще й той факт, що ПГ нерідко перебуває в асоціаціях з різними іншими мікроорганізмами – хламідіями, стрептококами, грибовою мікрофлорою тощо [20]. Зустрічаються змішані інфекції ПГ з гонококом, блідю трепонемою, ВІЛ [15], що свідчить про необхідність якнайретельнішого обстеження хворих із застосуванням сучасних діагностичних підходів.

Для встановлення діагнозу герпетичної інфекції використовують методи, перераховані в таблиці 2.

Цитологічний метод використовують для визначення характеру патологічного процесу (гострий чи хронічний) та для підтвердження діагнозу герпетичної інфекції. Як матеріал для дослідження беруться зішкряби з ділянок шкіри, уражених вірусом. Одна з найчіткіше виражених цитологічних ознак ПГ – поява велетенських багатоядерних епітеліальних клітин зі збільшеними ядрами та включеннями в ядрах; часто видно дисплазну епітелію [5]. Цитопатичний вплив вірусу виявляють як у хворих з симптоматикою ПГ, так і у безсимптомних випадках. Чутливість даного методу складає 30-60 % від загальної кількості випадків виділення вірусу [11].

стандартних контрольних панелей з наступним визначенням показників. При цьому сироватки позитивних контрольних панелей повинні бути охарактеризовані та представляти діапазон від ранньої сероконверсії до прояву захворювання, тобто повинні бути присутні сироватки, що містять антитіла в різних титрах – від найнижчих до найвищих.

Визначення специфічності тест-системи проводять при тестуванні великої кількості сироваток випадково вибраних здорових осіб з урахуванням показників первинної та повторної реактивності позитивних зразків в цій тест-системі з наступною верифікацією результатів.

Вивчення показників якості імуноферментних тест-систем для серологічної діагностики токсоплазмозу «DIA-Toxo-IgG» та «DIA-Toxo-IgM» проводили з використанням позитивних та негативних контрольних зразків Accurap 135 Toxo IgG Positive Control, Accurap 136 Toxo IgM Positive Control, Accurap 800 TORCH Negative Control, панелі сироваток, що містять антитіла до *T. gondii* у різних титрах PTT201 (BBI, США).

Результати оцінки інформативності імуноферментних тест-систем «DIA-Toxo-IgG» та «DIA-Toxo-IgM» на зразках панелі Anti-Toxoplasma Mixed Titer Performance Panel PTT201 (BBI, США) представлено в таблицях 4 та 5.

Таблиця 4. Оцінка інформативності імуноферментної тест-системи «DIA-Toxo-IgG» на зразках панелі Anti-Toxoplasma Mixed Titer Performance Panel RTT201 (BBI, США)

№ зразка панелі*	Sanofi EIA Toxo – IgG	BioMerieux VIDAS Toxo-IgG	DIA-Toxo-IgG
	МО/мл	МО/мл	МО/мл
РТТ201-01	117	56	125
РТТ201-02	21	13	21
РТТ201-03	<6	0	2
РТТ201-04	>240	279	>250
РТТ201-05	62	42	87
РТТ201-06	>240	293	>250
РТТ201-07	49	33	81
РТТ201-08	207	241	207
РТТ201-09	>240	264	>250
РТТ201-10	68	41	101
РТТ201-11	>240	>300	>250
РТТ201-12	205	122	>250
РТТ201-13	<6	0	2
РТТ201-14	56	54	70
РТТ201-15	88	66	97
РТТ201-16	52	45	72
РТТ201-17	>240	>300	>250
РТТ201-18	54	39	94
РТТ201-19	144	157	248
РТТ201-20	>240	119	99
РТТ201-21	<6	0	4
РТТ201-22	100	65	200
РТТ201-23	>240	>300	>250
РТТ201-24	44	31	168
РТТ201-25	104	>300	>250

* Зразки РТТ201-03 та РТТ201-21 – це негативні контролі панелі.

У хворих з частими рецидивами ПГ (6 разів на рік чи більше) порушення імунітету носять виражений характер, коли, з одного боку, виникає «виснаження» здатності лімфоцитів до синтезу ІЛ-2, а з другого – неспроможність клітин-ефекторів реагувати на медіатори клітинної проліферації та диференціації. Можливо, це пов'язане з блокуванням клітинних рецепторів Т-хелперів до ІЛ-2 чи пригніченням їхньої реактивності внаслідок того, що дуже часто відбувається загострення інфекції. У таких хворих спостерігають значне зниження кількості та зниження функціональної активності клітин Th1 та Th2 і, як наслідок – пригнічення як клітинної, так і гуморальної імунної відповіді.

Таким чином, на різних етапах формування протигерпетичного захисту організму можуть виникати різні послаблення імунної резистентності проти ВПГ; при цьому міра пригнічення клітинного імунітету та компенсаторне посилення гуморальної імунної відповіді відповідає значною мірою за частоту виникнення рецидивів захворювання. Очевидно, різні порушення імунного статусу вимагають відповідно й диференційованого підходу до їх подолання. У зв'язку з цим для вибору оптимальної схеми лікування хворого з герпетичною інфекцією необхідне ретельне його обстеження із залученням різних методів лабораторної діагностики.

Епідеміологія

Джерелом герпетичної інфекції буває лише людина з клінічною чи прихованою формою інфекційного процесу. У хворого з маніфестною формою віруси виявляються у вмісті пухирців, а також у слині, сечі, спермі, піховому секреті. У хворих з прихованою інфекцією відсутність ознак герпесу на шкірі не означає відсутності ВПГ у біологічних рідинах [2].

Загалом усі люди чутливі до ВПГ, і лише діти, народжені від серопозитивних матерів, захищені від зараження.

Герпетична інфекція передається багатьма шляхами. Найчастіше зараження відбувається при контакті з осередками ураження, наявними в хворій людини (на губах, слизовій оболонці ротової порожнини тощо), при використанні здоровими людьми предметів домашнього вжитку (посуд, рушники тощо), контамінованих вірусом. Поширенню інфекції сприяє успішна її передача статевим шляхом.

Вірусні білки гальмують функцію клітин Th1, які синтезують ІЛ-2 та гама-ІФН, що здійснюють розвиток клітинної імунної відповіді на вірус та відповідають за появу цитотоксичних лімфоцитів, завдяки яким з організму видаляються клітини, де міститься ВПГ (рис. 4).

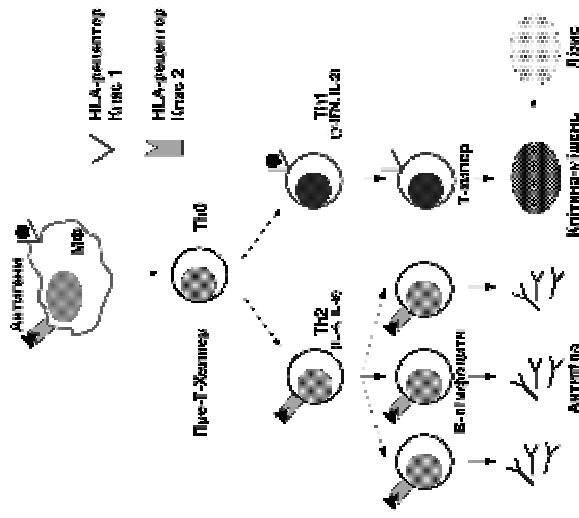


Рис. 4 Імунна відповідь при герпетичній інфекції

Вирішальну роль у пошкодженні клітинного імунітету при ПГ відіграє пригнічення продукції гама-ІФН, який стимулює диференціювання лімфоцитів Th0 у клітини Th1, що супроводжується до «переключення» клітинного імунітету на гуморальний [10]. У хворих з помірно частотою рецидивів ПГ зниження клітинного імунітету призводить до компенсаторного посилення синтезу цитокінів лімфоцитами Th2. У деяких хворих спостерігається підвищення синтезу ІЛ-6, що посилює проліферацію В-лімфоцитів, яка викликає помірне підвищення рівня специфічних антитіл проти ВПГ. В інших осіб зростає синтез ІЛ-4, який посилює активність В-лімфоцитів, викликаючи появу надзвичайно високих рівнів антитіл проти вірусу.

Таблиця 5. Оцінка інформативності імуноферментної тест-системи «DIA-Toxo-IgM» на зразках панелі Anti-Toxoplasma Mixed Titer Performance Panel PTT201 (BBI, США)

№ зразка панелі*	Sanofi EIA Toxo - IgM	BioMerieux VIDAS Toxo -IgM	DIA-Toxo-IgM
	ОГ/ГЗ	ОГ/ГЗ	ОГ/ГЗ
РТТ201-01-07	нег	нег	нег
РТТ201-08	>3,7	3,5	2,8
РТТ201-09-10	нег	нег	нег
РТТ201-11	>3,7	2,4	2,0
РТТ201-12	нег	нег	нег
РТТ201-13	>3,7	7,3	0,9
РТТ201-14-16	нег	нег	нег
РТТ201-17	1,5	1,5	1,3
РТТ201-18-22	нег	нег	нег
РТТ201-23	>3,7	10,3	3,6
РТТ201-24	нег	нег	нег
РТТ201-25	2,9	1,8	1,0

* Зразки РТТ201-03 та РТТ201-21 – негативні контролі панелі.

В таблицях наведено також результати досліджень панелі РТТ201 в аналогічних тест-системах імпортного виробництва (з паспорта панелі). При використанні тест-системи «DIA-Toxo-IgG» зразки РТТ-3, РТТ-13 та РТТ-21 були визначені як негативні, а інших 22 зразки – як позитивні, що збігається з паспортними даними панелі; чутливість тест-системи на зразках даної панелі становила 100 %. При використанні позитивного та негативного контрольних зразків Assigup 135 та Assigup 800 результати тестування збігаються з паспортними даними цих контролів.

При використанні тест-системи «DIA-Toxo-IgM» з 6 позитивних зразків, зразки РТТ201-8, РТТ201-11, РТТ201-17, РТТ201-23, РТТ201-25 відповідали паспортним даним. Оптична густина (ОГ) зразка РТТ201-13 лежала в “сірій” зоні значень ОГ тест-системи «DIA-Toxo-IgM». Результати досліджень контрольних зразків Assigup 136 та Assigup 800 відповідали паспортним даним цих контролів.

Крім того, проводили вивчення показників якості з використанням сироваток, отриманих від громадян України та охарактеризованих в аналогічних імуноферментних тест-системах «Platelia Toxo IgG» (Bio-Rad, США) та «UBI MAGIWEL TOXO-IgG» (United Biotech Inc., США). Серед досліджених 237 зразків сироваток, що містять антитіла класу IgG до T.gondii, в тест-системі «DIA-Toxo-IgG» не було виявлено хибнонегативних результатів. З 87 негативних на токсоплазмоз сироваток отримано один позитивний результат у тест-системі «DIA-Toxo-IgM»; при роботі з тест-набором «DIA-Toxo-IgG» всі зразки визначено як негативні.

Як вже згадували, у ході імуноної відповіді при первинній інфекції першими з'являються антитіла класу IgM, а пізніше – класу IgG, які мають низьку константу зв'язування з антигеном; далі авідність антитіл класу IgG зростає. Повторне зараження токсоплазмами також може викликати синтез антитіл класу IgM, ускладнюючи диференційну діагностику первинної та повторної інфекції. Тому для виявлення первинної інфекції доцільно визначати показник авідності специфічних антитіл класу IgG, присутніх у сироватці крові. Для цього на етапі відмивання досліджуваних сироваток користуються різними розчинами у паралельних пробах; один з них не впливає на зв'язок антитіл з антигеном, а другий вилучає низькоавідні антитіла з їхнього комплексу з антигеном. Таким чином було перевірено 32 сироватки дітей, інфікованих T. gondii. Усі сироватки містили специфічні антитіла класу IgG та дві з них – антитіла класу IgM. Індекс авідності антитіл класу IgG цих двох зразків сироваток склав 23 % та 33 %, в той час як для інших зразків цей показник лежав у межах 65-92 %. Низький показник авідності свідчить про низьку константу зв'язування специфічних антитіл з антигеном, що характерно для раннього етапу інфекції. Це підтверджується наявністю антитіл класу IgM до токсоплазми в цих зразках. Таким чином, визначення індексу авідності поряд з виявленням специфічних антитіл класу IgM може служити критерієм для оцінки тривалості інфекційного процесу. У подальшому дослідження в цьому напрямку буде продовжено.

Для визначення відсотку серопозитивності за допомогою тест-системи «DIA-Toxo-IgG» у різних вікових групах нами було досліджено 404 зразки сироваток крові донорів та 154 зразки

Таблиця 1 - Основні типи імуногенезу рецидивів простого герпесу

Характер імунних порушень	Перебіг ПГ
I- Тимчасові порушення: Лімфцитоз; зниження кількості та підвищення проліферації клітин CD4; зниження співвідношення CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ; підвищення кількості та активності ПКК та В-клітин; зниження синтезу альфа- та гама-ІФН; наявність специфічних IgG проти вірусу.	ПГ з нечастими рецидивами (1-2 рази на рік)
II- Імунодефіцит: A – зниження кількості та незначне зменшення функції клітин CD4 ⁺ ; зниження кількості та активності ПКК; зниження синтезу альфа- та гама-ІФН; посилення синтезу ІЛ-6; помірне підвищення рівня специфічних антитіл. B – зниження кількості та значне послаблення функції клітин CD4 ⁺ ; зниження кількості та активності ПКК; зниження синтезу альфа- та гама-ІФН; посилення синтезу ІЛ-4; надзвичайно високий рівень специфічних антитіл.	ПГ, що дає рецидиви з помірно частою (3-4 рази на рік)
III- Виражений імунодефіцит: значне зниження кількості та функції клітин CD4 ⁺ ; значне зниження кількості та активності ПКК; зниження продукції альфа- та гама-ІФН; зниження синтезу ІЛ-2, ІЛ-4 та ІЛ-6.	ПГ, який часто дає рецидиви (6 чи більше разів на рік)

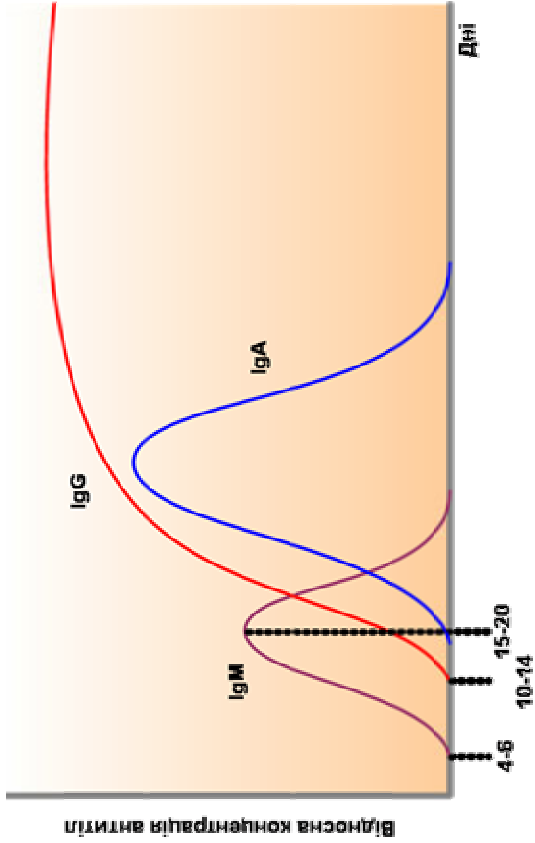


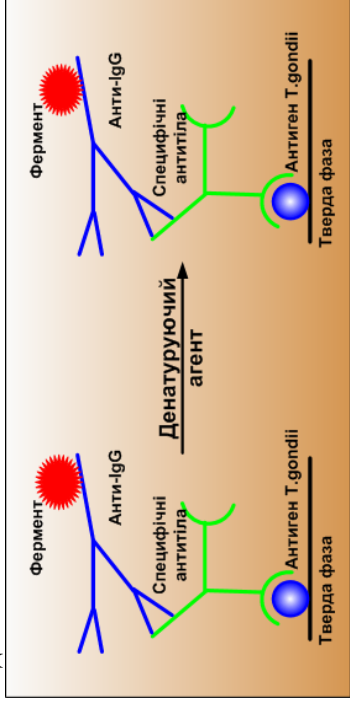
Рис.3 Серологічний профіль при герпетичній інфекції

Значну роль у підтримці місцевого імунітету та попередженні поширення інфекції відіграють мононуклеарні фагоцити та нейтрофіли [11]. Багато в чому розвиток та результат первинного зараження, а також клініка загострення хвороби та її перепинення залежать від здатності лейкоцитів до синтезу альфа-інтерферону [7].

Імунні пошкодження, що лежать в основі активації латентного збудника, можуть відрізнятися не лише за мірою їхньої вираженості, але й якісно [2]. Порушення показників інтерферонового статусу та цитотоксичної активності природних клієрних клітин (ПКК) завжди корелюють з тяжкістю захворювання й найбільш виражені у хворих з частими рецидивами простого герпесу. Функціональна недостатність субпопуляцій Т-хелперів – Th1 чи Th2, які відрізняються різними наборами продукованих цитокінів, призводить відповідно до пригнічення клітинної чи гуморальної відповіді на вірус. Основні типи імунотенезу рецидивів ПГ представлено в таблиці 1.

сироваток дітей. Антитіла класу IgG виявляли у 67,7 % донорів та 28,1% дітей.

Високоавідні антитіла



Низькоавідні антитіла

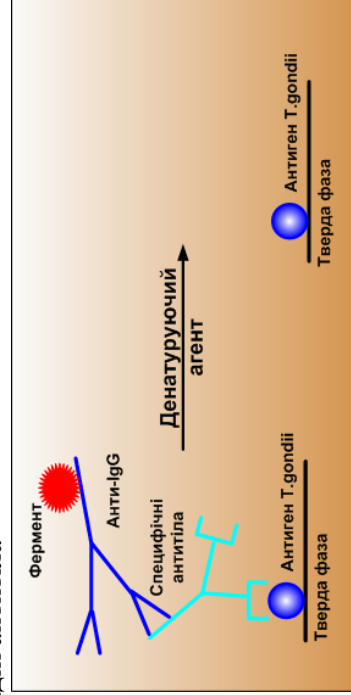


Рис.3- 4 Схеми визначення індексу авідності антитіл класу IgG

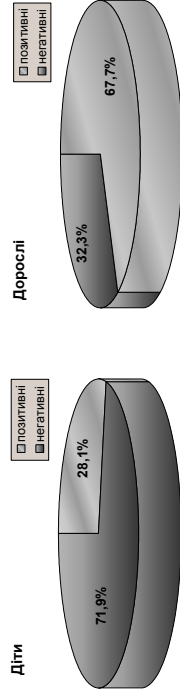


Рис. 5. Частота ресстрації антитіл класу IgG до *T.gondii* у різних вікових групах

Результати дослідження діагностичної цінності імуноферментних тест-систем «DIA-Toxo-IgG» та «DIA-Toxo-IgM» для серологічної діагностики токсоплазмозу, розроблених підприємством «Діапроф-Мед», з використанням комерційних панелей, стандартів та охарактеризованих зразків сироваток свідчать про високу чутливість та специфічність названих тест-систем.

Рецидивна форма ПГ дає, як правило, однотипну клінічну картину. Незалежно від локалізації висипань, загострення у більшості випадків починається з певних суб'єктивних відчуттів – «провісників рецидиву». В середньому вони виникають за добу до появи висипань на відповідній ділянці шкіри чи слизових оболонок; відчувається сверблячка, «припикання», а часом і болі. Далі герпетичний процес проходить 4 послідовних стадії – еритематозну, везикулярну, кіркову та клінічного одужання (відторгнення кірок); загальна тривалість процесу складає в середньому 7-14 днів [12]. Однак при достатній напруженості імунітету рецидиви ПГ можуть протікати нетипово, без утворення пухирців; йдеться про так звану abortivну форму ПГ, коли прояв інфекції обмежується лише початковою її стадією (суб'єктивними відчуттями та еритемою). Діапазон клінічних проявів захворювання – від носійства вірусу до генералізованих форм ПГ – визначається як біологічними властивостями збудника, так і імунореактивністю хазяїна.

Імунна система відіграє важливу роль у контролі за поширенням герпетичної інфекції в організмі. Імунний захист обумовлений взаємодіями та спільною участю специфічних та неспецифічних факторів клітинного та гуморального імунітету. При зараженні ВПГ спостерігають послідовний синтез антигел класів IgM, IgG та IgA [2]. Основна їхня дія направлена на блокування збудника за рахунок утворення імунних комплексів антиген-антитіло; у такий спосіб послаблюється його загальний згубний вплив на організм. Імуноглобуліни класу IgM з'являються на 4-6-й день після зараження та досягають найвищого рівня на 15-20-у добу (рис. 3). З 10-14-го дня розпочинається синтез специфічних IgG, які пожиттєво зберігаються в організмі людини [14].

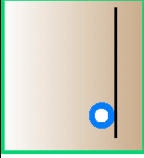
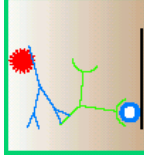
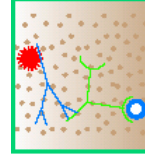
При клінічному перебігу герпетичної інфекції розрізняють первинний та рецидивний герпес. ВПГ викликає інфекцію з латентною персистенцією. Здатність вірусу переходити в латентну форму забезпечує йому «неушкодженість» при вірусемії після первинного інфікування та при наступних загостреннях хвороби.

Вірус знаходиться в клітинах паравентрального сенсорного ганглію в інтегрованому чи у вільному непродуктивному стані. При послабленні імунного контролю, вірус активується, переміщується з ганглію по аксону периферичного нерва до клітин епітелію, де проходить його розмноження.

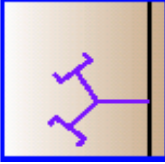
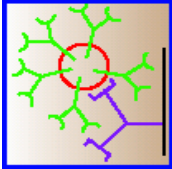
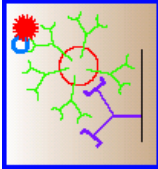
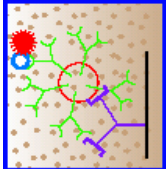
Репродукція вірусу та вихід з ганглію незначної кількості часточок вірусу відбувається постійно. Доходячи по нерву до епітелію, вірус утворює мікроосередки (мікрофокуси) інфекції; подальший розвиток її стримується механізмами місцевого та загального імунітету. Пригнічення цих механізмів створює умови для розмноження вірусу, призводячи до рецидивів. Таким чином, початкові прояви герпетичної інфекції можуть розвиватися внаслідок активзації вірусу у тих областях, з якими пов'язані його клінічні прояви. У період же розпаду хвороби, який настає звичайно через 2-3 дні після початку маніфестації, цитопатичний ефект може забезпечуватися за рахунок розмноження збудника, що мігрував з нервових гангліїв. Зростання кількості ВПГ в організмі стимулює всі ланки імунітету та призводить до відновлення контролю імунних механізмів за репродукцією збудника.

Первинний герпес – це гостра інфекція, що започатковується при першому контакті людини з ВПГ на фоні відсутності специфічних антитіл до вірусу. Первинний герпес, як правило, спостерігають у дітей у віці 2-5 років і значно рідше – в дорослих людей. Часто захворювання в дитячому віці пов'язується зі значним зниженням кількості протигерпетичних антитіл, які передані дитині від матері; таке зниження починається наприкінці першого року життя та повністю завершується до третього року життя дитини [8]. Захворювання завжди починається гостро. Типові для первинного герпесу нагромадження пухирців на фоні набряку та гіперемії шкіри займають велику площу; помітні набряки регіональних лімфовузлів; часто розвивається вірусемія та ураження інших органів; різко нарастає рівень противірусних антитіл у сироватці крові [11].

DIA-TOXO-IgG
Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Політиролові стрипи, сенсibilізовані антигеном T.gondii	
- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл розведених 1:50 зразків контролів та сироваток - Інкубація протягом 60 хв при 37 °C - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі - Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню з ТМБ - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) - Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту - Реєстрація оптичної густини	

DIA-TOXO-IgM
Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiliзовані моноклональними антитiлами до iмуноглобулiнiв класу IgM	
- Внесення в лунки стрипiв по 90 мкл розчину для розведення зразкiв та по 10 мкл зразкiв контролiв та сироваток - iнкубацiя протягом 60 хв при 37 °C - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - iнкубацiя протягом 30 хв при 37 °C - Промивання лунок буферним розчином 6 разiв	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню з ТМБ - iнкубацiя протягом 30 хв при кiмнатнiй температурi (забарвлення) - Зупинка реакцiї додаванням стоп-реагенту - Ресстрацiя оптичної густини	

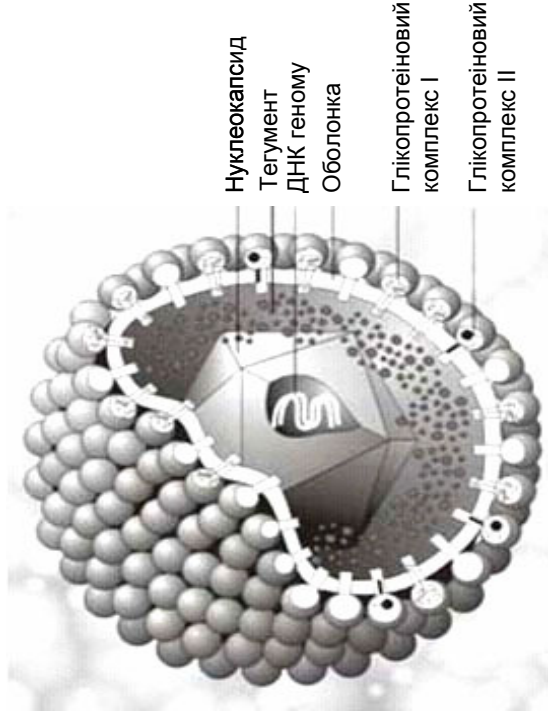


Рис. 2. Структура вірусу простого герпесу

Основна особливість вірусів герпесу, включаючи ВПГ – це їхня здатність до тривалого переживання в неактивному стані.

ВПГ термолабільні; вони гинуть при температурі 50 °С через 30 хв., при температурі 100 °С – через 5 хв. ВПГ відносно нестійкі також при кімнатній температурі, але досить тривалий час (до декількох місяців) можуть зберігатися при температурі мінус 70 °С [2].

Раніше вважали, що ВПГ1 вражає винятково обличчя та слизові оболонки ротової порожнини, а ВПГ2 – зовнішні статеві органи. Сьогодні є дані [3] про тропізм, спільний для обох типів вірусу. Встановлено також можливість ураження обома вірусами різних органів, що свідчить про системний характер проявів герпетичної інфекції [5].

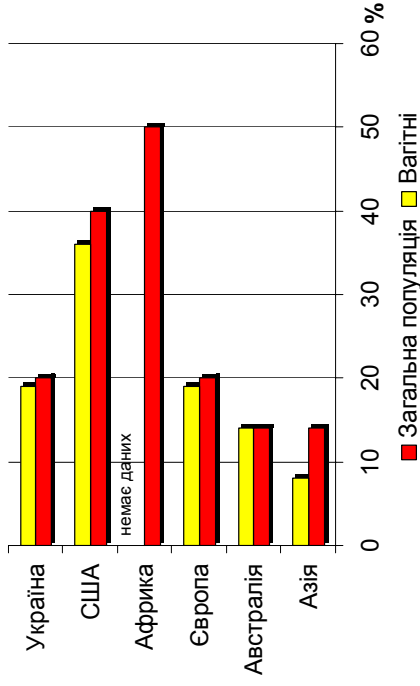


Рис. 1. Поширеність вірусу простого герпесу типу 2

Етіологія та патогенез

ВПГ – представник ДНК-вмісних вірусів родини герпесвірусів. Згідно з класифікацією, затвердженою на X Міжнародному з'їзді мікробіологів (1970 р.), він входить до підродини альфа-герпесвірусів, які характеризуються коротким циклом репродукції, високою тропністю до клітин епітеліоїдного ряду та вираженою цитопатичною дією.

Розміри ВПГ – 100-160 нм. Вірусна часточка складається з трьох компонентів – нуклеоїда, розташованого в центрі віріона, капсида, що оточує віріон, та зовнішньої оболонки, в якій лежать ці структури (рис. 2).

Очищені повноцінні вірусні часточки більш як на 20 % складаються з ліпідів, причому всі ліпіди входять до складу вірусної оболонки [1, 2].

Виділено два серотипи вірусу – ВПГ1 та ВПГ2, що мають спільний групспецифічний нуклеокапсидний антиген та різні типоспецифічні антигени, пов'язані як з нуклеокапсидом, так і з ліпопротеїновою оболонкою.

Література

1. Агасієва Е.О., Венцовський Б.М., Ковальова Н.М. та ін. Діагностика і профілактика токсоплазмозу у вагітних і дітей. //Інфекційні хвороби. – 1996. –№1. –с.48-51.
2. Возианова Ж. И. Инфекционные и паразитарные болезни. – Т.3. – К.: „Здоров’я”. – 2002. – с.285- 315.
3. Грачева Л.И. Проблема токсоплазмоза. //Педиатрия. –1999. – №4. – с.83-86.
4. Денисова Л.Б., Воронова С.В., Шведов В.А. К вопросу диагностики врожденного токсоплазмоза. //Вестник рентгенологии и радиологии. – 1999. – №1. – с.45-47.
5. Дубинська Г.М., Ізюмська О.М., Козюк П.М. та ін. //Токсоплазмоз. Клініка, діагностика та лікування. //Вести медицини и фармации. – 2003. – №1. – с.23-25.
6. Ершова И.Б., Бойченко П.К. Диагностические аспекты токсоплазмоза у детей. //Журнал практического врача. – 2000. – №5. – с.44-46.
7. Казанцев А.П. Токсоплазмоз. Ленинград: “Медицина”. – 1985. – 167 с.
8. Ковалева Н.М. Токсоплазмоз как оппортунистическая инфекция. //Сучасні інфекції. – 2000. – №1. – с.44-50.
9. И.Н.Кувшинова. Токсоплазмоз. //Информационный бюллетень “Новости” Вектор- Бест”. – 1997. – №2 (4).
10. Липковська І.В. Клініко-патогенетичні аспекти токсоплазмозу. //Інфекційні хвороби. – 2000. – №4. – с.61-64.
11. Руководство по инфекционным болезням. Под ред. Ю.В.Лобзина. – С-Петербург: “Фолиант”. – 2000. – 932 с.
12. Марков И.С. Діагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза. Киев: АртЕк – 2002 – 192 с.
13. Маричев І.Л. TORCH-інфекції: сучасні аспекти діагностики. Лаб. діагностика. – № 4. – 2004. – с.43-46.

КРАСНУХА

Краснуха – вірусна інфекційна хвороба, яка характеризується висипаннями на шкірі, що нагадують кір, генералізованою лімфаденопатією, помірною інтоксикацією та нетривалою лихоманкою. Зазвичай захворювання протікає швидко та у легкій формі. Особливе значення краснухи як інфекційного захворювання пов'язане з небезпечною тяжких ускладнень для дитини, що можуть розвинутися при зараженні матері в період вагітності. Тератогенна дія вірусу краснухи (ВК) може стати причиною вад розвитку плоду, викиднів, народження мертвих немовлят. Дієвий засіб профілактики цього захворювання – вакцинація здорового населення, що проводиться в багатьох країнах світу, а з 2000 р. і в Україні.

Зважаючи на те, що рівень захворюваності на краснуху в нашій країні залишається високим, ймовірність захворювання жінок дітородного віку, включаючи й вагітних, очевидна. А з огляду на те, що симптоми захворювання на краснуху часто мало виражені, а у 30-50 % випадків захворювання перебігає без помітних проявів [15], особливо важливого значення набувають лабораторні методи діагностики, які застосовуються, щоб підтвердити зараження ВК та оцінити рівень захисного імунітету у здорових осіб. Сьогодні найширшого застосування серед цих методів діагностики набув імуноферментний аналіз.

Етіологія та патогенез

Збудник краснухи – це вірус роду Rubivirus, що належить до родини Togaviridae. Віріони являють собою сферичні часточки діаметром 60-70 нм, що містять РНК; на поверхні віріонів зрідка видно ворсинки завдовжки 8 нм. На відміну від інших тогавірусів збудник краснухи містить нейрамінідазу. Вірусові притаманна здатність аглютинувати та розчиняти (гемолізувати) еритроцити. Вірус відносно малостійкий при потрапленні в довкілля; при кімнатній температурі він гине через декілька годин, а при кип'ятінні – через декілька хвилин. ВК погано переживає висушування, дію прямого сонячного проміння, розчинників та детергентів. При заморожуванні він добре

ГЕРПЕС

Простий герпес (ПГ, герпетична інфекція) – це хронічне рецидивне інфекційне захворювання, викликане вірусами простого герпесу (ВПГ) типів 1 та 2. Хвороба перебігає в локалізованих формах з пухирцевими висипаннями на шкірі та слизових оболонках, а також у генералізованих формах з ураженням багатьох органів.

Актуальність герпетичної інфекції обумовлена дуже широким розповсюдженням збудників. За даними ВООЗ, біля 90 % населення нашої планети інфіковано ВПГ, а приблизно у 10-20 % заражених осіб спостерігають певні клінічні прояви герпетичної інфекції [2].

Біля 20 % дорослого населення планети інфіковано ВПГ2 [2]. Найчастіше цей тип вірусу стає збудником герпесу статевих органів та герпесу новонароджених; лише у 20 % всіх випадків процес викликається ВПГ1.

На рисунку 1 представлено дані ВООЗ про розповсюдження ВПГ2. Від початку 70-х рр. минулого століття в США та європейських країнах відмічено різке зростання захворюваності на генітальний герпес, яка на початок 1980-х рр. зросла у 10 разів. Причина такого швидкого розповсюдження вірусу в тому, що у більшості випадків інфекція ВПГ2 не діагностується, бо у 60 % випадків генітальний герпес протікає нетипово, а у 20 % випадків – безсимптомно [8].

Генітальна інфекція, викликана ВПГ2, спричиняє рецидиви значно частіше порівняно з інфекцією, спричиненою ВПГ1, а перебіг її супроводиться більш вираженими патологічними змінами. ВПГ2 може призводити до злоякісної трансформації клітин, а у вагітних жінок – до викиднів та вроджених вад розвитку плоду. Ця інфекція може стати причиною неонатального зараження з тяжкими наслідками (до враження ЦНС і дисемінованої форми герпесу) [8, 11].

26. Stagno S., Remington J.S., Klein J.O. Cytomegalovirus// Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. – Philadelphia, 1990. – P. 241-281.

зберігається (декілька років при температурі мінус 70 °C) [2].

При зараженні людини розмноження ВК відбувається в шийних лімфатичних вузлах, звідки він через тиждень потрапляє в кров [1]. Інкубаційний період при краснушній інфекції триває 11-24 дні. Симптоми захворювання часто мало виражені, і в 30-50 % випадків інфікування хвороба протікає в субклінічній формі [2, 15].

У дітей захворювання характеризується відносно неважкими симптомами та починається з появи характерних висипань. У дітей старшого віку та дорослих висипанням можуть передувати продромальні явища – загальне ослаблення, головний біль, підвищення температури та системне збільшення лімфовузлів. Висипання, як правило, спочатку з'являються на обличчі та швидко поширюються по всьому тілу.

Ускладнення при краснушній інфекції трапляються рідко, причому частіше зустрічаються в дорослих; при цьому можуть бути уражені суглоби рук у вигляді артралгій та поліартритів. Найтяжче ускладнення (хоча воно й рідко трапляється) – ураження центральної та периферичної нервової системи, енцефаліт [7].

Розрізняють дві форми хвороби – набуту та вроджену. Вони суттєво відрізняються, перш за все за механізмом передачі. ВК може передаватись двома шляхами: горизонтальним (від хворого до здорового) та вертикальним (від матері до плоду). Під час вагітності вірус проявляє особливий тропізм до ембріональних тканин; у перші тижні вагітності ураження ембріона відбувається через кров матері та через хоріон під час загальної вірусемії у вагітної. В подальшому, після формування плаценти, переважає трансплацентарний характер інфікування. Ураження плоду вірусом краснухи різноманітні, причому ступінь ураження не залежить від клінічних проявів краснухи у вагітної. Ще в 1941 р. Норман М. Грег описав епідемію вроджених катаракт, що спостерігались у дітей, народжених жінками, які хворіли на краснуху під час вагітності.

Сьогодні відомо, що частота та міра ураження плоду значною мірою визначаються тривалістю вагітності на момент зараження; до 85 % немовлят, інфікованих у перший триместр вагітності, народжуються з різноманітними вадами органів; в той же час вади розвитку плоду рідко зустрічаються при інфікуванні після двадцятого тижня вагітності [15].

Наслідки інфікування плоду – синдром вродженої краснухи (СВК) – включає ураження очей (повну або часткову втрату зору), органів слуху (повну або часткову глухоту) та вади розвитку серця. Крім того, встановлено, що при уродженій краснушній інфекції можуть виникнути такі пізні ускладнення, як паненцефаліт, цукровий діабет, тиреоїдит. Найчастіше зустрічається глухота новонароджених; у багатьох випадках вона стає єдиним підтвердженням вродженої краснухи при зараженні плоду на 4-му місяці вагітності. Вади розвитку серця та ураження очей (катаракта, глаукома) часто формуються при інфікуванні протягом перших 8 тижнів вагітності [7].

У нашій країні визначити питому вагу вродженої краснухи серед інфекційної патології немовлят досить важко, оскільки система моніторингу за вродженою краснухою майже не проводиться. Захворювання реєструється у комплексі з іншими хворобами, що складають єдину групу інфекцій, специфічних для перинатального періоду (окрім сепсису та сифілісу) [4], а належна лабораторна діагностика інфекцій цієї групи не проводиться. За даними ВООЗ, кількість випадків вродженої краснухи складає від 0,13 % до 2 % від загальної кількості захворювань на краснуху. Зважаючи на те, що в епідемічні роки в Україні реєструється 100-160 тис. випадків інфікування на рік, можна припустити, що кількість дітей, народжених з СВК, в такі роки становить від 130 до 3.000 випадків [3].

Перенесене захворювання, включаючи й хворобу в субклінічній формі, призводить до становлення позитивного імунітету.

При вакцинації, як і при первинному інфікуванні ВК, в організмі людини формується гуморальна імунна відповідь. Першими в крові з'являються специфічні імуноглобуліни класу М; при зараженні вони з'являються на 3-5-у добу після появи висипань та досягають максимальної концентрації на 7-10-у добу; при вакцинації антитіла цього класу починають виявлятися в крові на третьому-четвертому тижні. Специфічні ж антитіла класу IgG з'являються в крові на 7-10-у добу клінічних проявів, досягають максимуму через 4-5 тижнів та залишаються на високому рівні протягом тривалого часу. Під час вакцинації перші специфічні антитіла класу IgG реєструються на 4-5 – му тижні та досягають піку через 5-6 тижнів.

13. Серов В.Н., Манухин И.Б., Кузьмин В.Н. Цитомегаловирусная инфекция в патологии беременности и плода// Акушерство и гинекология. – 1997. – №6. – с.16-19.
14. Смілянська М.В. Лабораторна діагностика цитомегаловирусної інфекції // Інфекційні хвороби. – 1998. – №2. – с.50-52.
15. Ходак Л.А. Сучасні погляди на герпесвірусні інфекції// Інфекційні хвороби. – 1997. – №4. – с.42-44.
16. Ходак Л.А., Андрейчин М.А., Панченко Л.О., Кириченко І.І. Можливості лабораторної діагностики цитомегаловирусної інфекції // Інфекційні хвороби. – 1998. – №4. – с.47-51.
17. Чернышова Л.И. Цитомегаловирусная инфекция // Сучасні інфекції. – 1999. – №3. – с.71-79.
18. Ho M. Cytomegalovirus Biology and Infection. Plenum Medical Book Co. York 1991.
19. Kraat Y.J., Hendrix R.M.G., Landini M.P. et al. Comparison of four techniques for detection of antibodies to cytomegalovirus// J. Clin. Microbiol. – 1992. – V.30, No. 2. – P.522-524.
20. Landry M.H., Maryo D.R., Hsiung G.D. Rapid and accurate viral diagnosis // Pharmac. Ther. – 1989. – V.40, №2. – P.287-328.
21. Lazzarotto T., Ripalti A., Bergamini G. et al. Development of a new cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM// J. Clin. Microbiol. – 1998. – V.36, No. 11. – P.3337-3341.
22. Metselaar H.J., Rothbarth P.H., Brouwer R.M. et al. Prevention of cytomegalovirus-related death by passive immunization. A double-blind placebo-controlled study in kidney transplant recipients treated for rejection// Transplantation. – 1989. – V.48. – P.264-266.
23. Pappin A., Grissom M., Mackay W. et al. Stability of cytomegalovirus antibodies in plasma during prolonged storage of blood component// Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1995. – V.2, No. 1. – P.25-29.
24. Pass R.F. Cytomegalovirus infection// Pediatrics in Reviews. – 2002. – V.23, No. 5. – P.25-29.
25. Revello M.G., Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant// Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V.15, No. 4. – P.680-715.

Література

1. Анохин В.А. Современные принципы клинико-лабораторной диагностики герпетических инфекций//Казанский медицинский журнал. – 1999. – т.LXXX, №2. – с.127-129.
2. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. – Т.3. – К.: “Здоров’я”. – 2002. – с.115-137.
3. Демидова С.А. и др. Цитомегаловирусная инфекция человека. – М., 1976.
4. Ершов Ф.И., Касьянова Н.В. Цитомегаловирусная инфекция (современные данные об эпидемиологии, клинике, диагностике и терапии)// Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т.4. – №4.
5. Капранова Е.И., Белоусова Н.А., Мельникова Е.В. и др. Клиническое течение и диагностика внутриутробных инфекций у новорожденных// Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1997. – №1. – с.27-30.
6. Каражас Н.В. Цитомегаловирусная инфекция – современная диагностика // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – №2. – с.16-17.
7. Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Евсеева Л.Ф. Лабораторная диагностика цитомегаловирусной инфекции // Клин. лаб. диагностика. – 2000. – №8. – С.15-16.
8. Кистенева Л.Б., Мартынов К.А., Хижнякова Т.М., Чешик С.Г. Цитомегаловирусная инфекция у беременных. Диагностика, трактовка результатов обследования// Вопр. вирусол. – 2003. №6. – с.4-8.
9. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Цитомегаловирусная инфекция // Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. – М.: Медицина, 1995. – с.141-173.
10. Матвеев В.А. Цитомегаловирусная инфекция как фактор иммуносупрессии для детей первого года жизни// Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1998. – №6. – с.34-36.
11. Прилуцкий А.С. Диагностика цитомегаловирусной инфекции у беременных женщин, плода, новорожденных// Лаб. диагностика.- 2003. – №2. – С.3-7.
12. Самохин П.А. Цитомегаловирусная инфекция у детей. – М., 1987.

Динаміка серологічних маркерів при краснушній інфекції

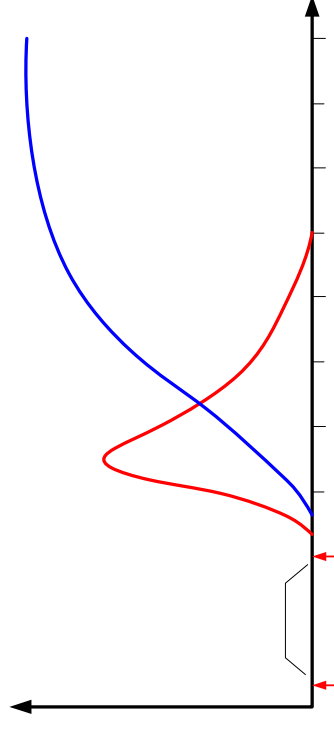


Рис.1

Динаміка серологічних маркерів при вакцинації проти краснухи

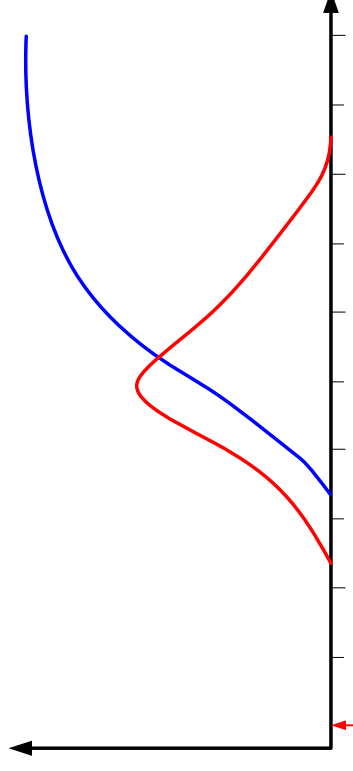


Рис.2

При вивченні клітинної імунної відповіді на антигени ВК у хворих на краснуху було встановлено, що в перші дні з моменту появи

симптомів хвороби порушення функції лімфоцитів пов'язані з безпосередньою персистенцією в них вірусу. Доказом цього є дані щодо виявлення в лімфоцитах периферичної крові хворих на краснуху високомолекулярних РНК, відсутніх у здорових осіб [5].

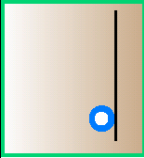
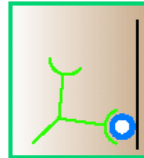
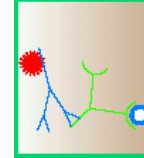
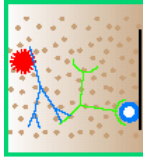
Найважче в даний період зміна функціональної активності лімфоцитів характеризується, головним чином, зниженою імунною відповіддю на мітогени. Не виключено, що механізми, які призводять до пригнічення клітинної імунної відповіді на мітогени в хворих на краснуху, можуть бути в ряді випадків зумовлені підвищеним синтезом клітинами простагландинів, в результаті взаємодії агрегованих імуноглобулінів з макрофагами та лімфоцитами. Аналізуючи роль інтерлейкіну-2 у клітинній відповіді на антигени ВК та неспецифічні мітогени, встановили [5], що приблизно у третини хворих у перші два-три дні від появи висипань знижена імунна відповідь на фітогемаглютинін та конканавалін А може бути пов'язана з недостатнім рівнем синтезу інтерлейкінів. Тож зміни імунної відповіді на неспецифічні мітогени в перші дні захворювання пов'язані з безпосередньою дією ВК на лімфоїдні клітини. Подальший хід розвитку імунодефіцитного стану в хворих на краснуху досить складний та пов'язаний з порушенням функції як клітинного, так і гуморального імунітету.

У деяких хворих імунодефіцитний стан сприяє активзації вторинної мікрофлори, яка й зумовлює розвиток або бронхіту, або пневмонії. Ще одне досить поширене ускладнення при краснушній інфекції – ураження суглобів. Згідно з деякими дослідженнями, артралгії та артрити можуть зустрічатись у третини всіх дорослих, хворих на краснуху (переважно жінок). Детальний аналіз стану імунної системи у цієї групи хворих дав авторам змогу припустити можливість тривалої персистенції вірусу у Т- і В-лімфоцитах, яка змінює функціональну активність імунокомпетентних клітин та може викликати синтез ними антитіл проти власних антигенів [5].

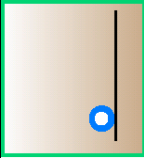
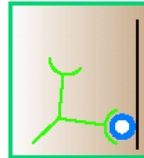
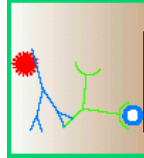
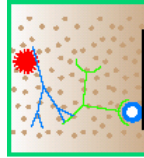
Епідеміологія та профілактика

Краснуха належить до широко розповсюджених хвороб, що обумовлюється легкістю інфікування, тривалим виділенням збудника, а часто – ще й невиразністю клінічної симптоматики. За даними ВООЗ, з усіх випадків краснухи, що реєструються в Європі,

DIA-CMV-IgM Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стріпи, сенсibilізовані рекомбінантним антигеном цитомегаловірусу	
- Однократне промивання лунок буферним розчином - Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розчину для розведення зразків та по 10 мкл зразків контролів та сироваток - Інкубація протягом 60 хв при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло) - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - Інкубація протягом 30 хв при 37 °С (формування комплексу з кон'югатом) - Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню та ТМБ - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) - Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту - Реєстрація оптичної густини	

DIA-CMV-IgG
Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibilізовані рекомбінантними антигенами цитомегаловірусу	
- Однократне промивання лунок буферним розчином - Внесення в лунки стрипів по 90 мкл розчину для розведення зразків та по 10 мкл зразків контролів та сироваток - Інкубація протягом 60 хв при 37 °C (формування комплексу антиген-антитіло) - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (формування комплексу з кон'югатом) - Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню з ТМБ - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) - Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту - Реєстрація оптичної густини	

83% припадає на країни СНД [8]. Більшість людей переносять хворобу здебільшого в легкій формі переважно в дитячому віці. Разом з тим для жінок дітородного віку, що не хворіли на краснуху, ця інфекція становить серйозну проблему. Співвідношення клінічних та субклінічних форм у дітей складає 1:1,5, а у дорослих 1:5-1:6 [2].

Для цього захворювання характерний хвилюподібний епідемічний процес з суттєвим підйомом рівня захворюваності що чотири-шість років, причому максимальна кількість випадків захворюваності припадає зазвичай на зимово-весняний період [3]. На рисунку 3 показано захворюваність на краснуху в Україні протягом останніх дванадцяти років.

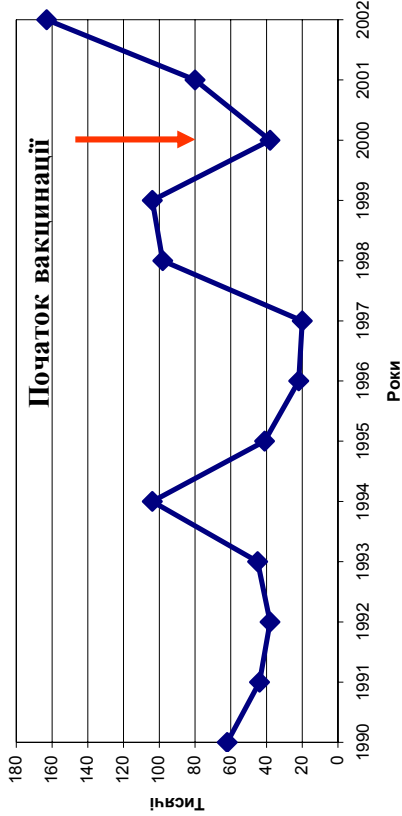


Рис 3. Динаміка захворюваності на краснуху в Україні, 1990-2002 роки.

*Джерело: База даних «Здоров'я для всіх», Україна, вересень 2003 г.

Найвища захворюваність спостерігається серед дітей 3-6 років [6]. Захворювання на краснуху у дитячому віці перебігає звичайно у легкій формі та закінчується одужанням. У дорослих це захворювання може ускладнюватись артритом та артралгією [7].

Механізм передачі ВК – повітряно-крапельний, що обумовлює швидке його поширення в дитячих неімуних колективах. Оскільки

вірус можна виявити у слизі носоглотки, сечі та фекаліях хворих, то не виключена можливість поширення інфекції контактно-побутовим шляхом, особливо у закритих дитячих колективах. Самостійного значення набуває вертикальний шлях зараження; передача ВК від хворої матері до дитини можлива в усі періоди хвороби, але особливо небезпечна для плоду, зараженого під час першого триместра вагітності [3].

Дієвий захід профілактики краснухи та попередження народження дітей з СВК – проведення масових щеплень здорового населення, що зараз здійснюється в більшості країн світу. З початком введення вакцинації населення суттєво знижується рівень захворюваності на краснуху. В США, наприклад, введення програми масового щеплення населення дало змогу знизити кількість випадків народження дітей з СВК більш як на 99 %, від 57.686 випадків у 1969 р. до 176 випадків у 2000 р. і ще меншої їх кількості в 2001 р. [15]. За станом на квітень 2000 р., 52 % країн світу ввели щеплення проти краснухи до своїх національних програм вакцинації. Однак у випадку часткової імунізації населення (лише дітей у віці 1 року) може спостерігатися підвищення захворюваності на краснуху серед дорослих, і, відповідно, випадків народження дітей з СВК [9, 11]. Крім того, відомо, що однократна вакцинація формує захисний імунітет протягом 15 років; наприкінці цього періоду в частини вакцинованих напруженість імунітету проти ВК знижується. У літературі описано досить багато випадків повторного інфікування вакцинованих осіб [10]. Тож в багатьох країнах світу (включаючи й Україну) затверджено двоетапну програму вакцинації дітей у віці 1 року з наступною ревакцинацією через 13-15 років [12] або ж запропоновано повторну програму вакцинації жінок репродуктивного віку з низьким рівнем захисного імунітету. Нижче наведено приклад такої настанови з вакцинації.

З метою вивчення рівня інфікованості ЦМВ серед населення України, ми провели дослідження по виявленню антитіл класів IgG до ЦМВ з використанням тест-системи «DIA-CMV-IgG» серед осіб різних вікових груп (623 сироваток крові дорослих людей та 408 сироваток дітей віком до 7 років).

Встановлено, що специфічні до ЦМВ IgG присутні у 96 % донорів та 73 % дітей (рис.3). Необхідно відмітити, що при тестуванні даних сироваток відмічено 100 %-ний збіг результатів виявлення специфічних антитіл класу IgG при використанні тест-систем «DIA-CMV-IgG» та «Cytomegalovirus IgG ELISA» (NovaTec, Німеччина).

При дослідженні специфічності розроблених тест-систем використано 52 сироватки з негативним результатом тестування на антитіла до ЦМВ в тест-системах «Cytomegalovirus IgG ELISA» (NovaTec, Німеччина) та «UBI MAGIWEL CMV-IgM» (United Biotech Inc., США). Усі зразки визначено як негативні в тест-системах «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM».

Таким чином, результати тестування імуноферментних тест-систем «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM» на панелі сироваток та на контрольних зразках Ассигн відповідають паспортним даним на них. Дані, отримані при дослідженні сироваток громадян України на тест-системах «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM», збігаються з результатами тестування всіх цих сироваток в аналогічних імуноферментних діагностикумах. Отримані дані вказують на високу якість розроблених тест-наборів, що можуть використовуватись для диференціації первинної інфекції від паст-інфекції; для виявлення груп ризику, до яких належать вагітні та пацієнти перед трансплантацією тканин та органів; для контролю лікування хворих з ЦМВІ.

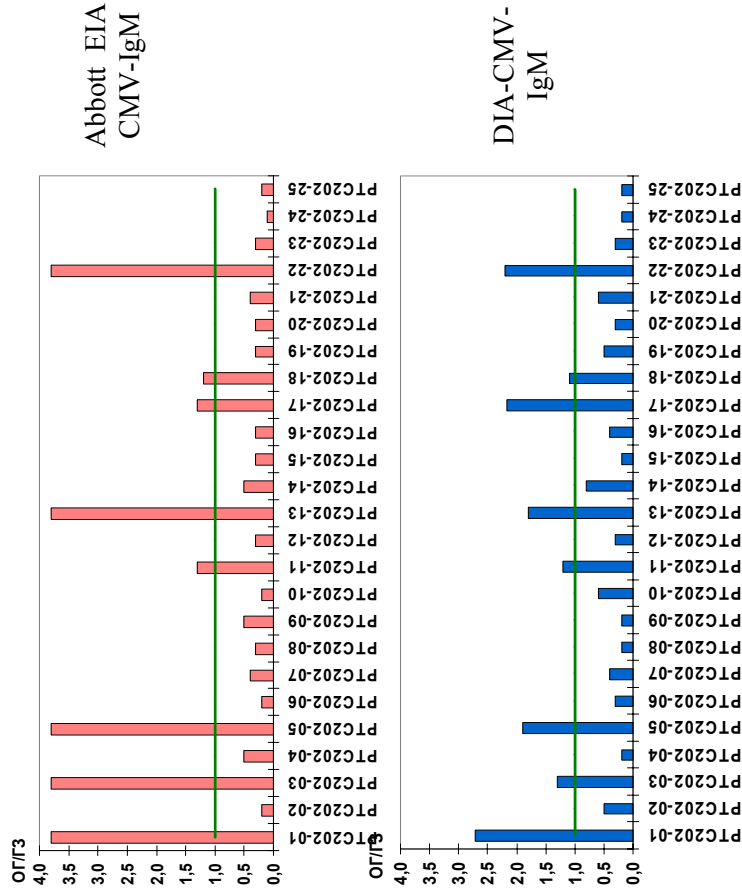


Рис. 7. Оцінка інформативності імуноферментної тест-системи «DIA-CMV-IgM» на зразках панелі Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PTC202 (BBI)

При тестуванні панелі PTC202 у тест-системі «DIA-CMV-IgM», результати якого представлено на рисунку 7, усі позитивні зразки виявляються позитивними, а негативні, серед яких і зразок, що містить ревматоїдний фактор (PTC202-04) – негативними. Аналогічно до наведених у паспорті даних щодо тестування панелі в інших тест-наборах, у тест-системі «DIA-CMV-IgM» встановлено зниження титру антитіл класу IgM проти ЦМВ у зразку PTC 202-05, отриманому через 14 днів від того ж донора, що і зразок PTC202-01.

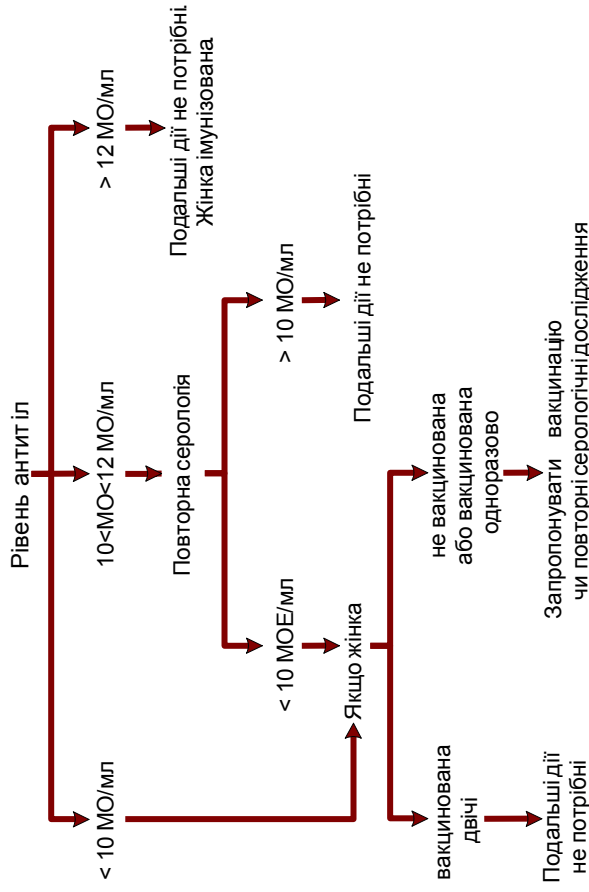


Рис.4. Настанова з вакцинації жінок з низьким рівнем антитіл
* Джерело: Immunization Hand Book, Ministry of Health, New Zealand 2002.

Лабораторна діагностика

Підозра на краснуху, особливо під час епідемії, виникає при появі типових висипань, кон'юнктивіту та фарингіту, а також при збільшенні завушних та шийних лімфатичних вузлів, артралгіях, поліартриті. Висипання необхідно відрізняти від схожих проявів при захворюванні на кір, ентеровірусних інфекцій та алергій на лікарські препарати. Зважаючи на те, що часто краснуха протікає в субклінічній формі, самих лише клінічних симптомів для встановлення діагнозу недостатньо.

ВК можна виділити з носоглотки, крові, сечі та спинномозкової рідини. Він виділяється за тиждень чи два тижні після появи висипань, однак максимальне вірусне навантаження спостерігається на 4-й день після появи симптомів [15]. Через трудомісткість виділення ВК цей

метод дуже рідко використовують для діагностики захворювання, хоча його можна застосувати для діагностики вродженої краснухи.

Недавно запропоновані сучасні методи виявлення РНК вірусу краснухи, що базуються на ампліфікації нуклеїнових кислот (у тому числі – RT-PCR) довели свою корисність; однак, зважаючи на високу вартість, вони рідко застосовуються в рутинних діагностичних дослідженнях. Частіше їх використовують для діагностики хвороби у плоду та новонароджених.

Лабораторна діагностики краснухи сьогодні базується, головним чином, на використанні серологічних тестів. Серологічні методи діагностики найчастіше використовуються для підтвердження клінічної картини захворювання та оцінки захисного імунітету. Ще донедавна широко використовували метод титрування антитіл в РІГА – реакції гальмування гемаглютинації. Метод досить простий у виконанні, проте має ряд недоліків – недостатню специфічність та чутливість (у дітей до чотирьох років хибно-негативні результати можна отримати в 25 % випадків); крім того, метод не дає змоги розрізнити специфічні антитіла класів IgG та IgM.

На сучасному етапі для діагностики краснухи та проведення епідеміологічних досліджень широко застосовують метод імуноферментного аналізу (ІФА). Імуноферментні тести для визначення специфічних антитіл базуються на різних варіантах ІФА – непрямого, конкурентного та ІgM-“пасті”. За допомогою ІФА можна швидко визначити як наявність антитіл до ВК, так і клас специфічних імуноглобулінів. Це дає змогу діагностувати стадії хвороби. Надійним доказом гострої краснушної інфекції є присутність у сироватці специфічних антитіл класу IgM, значне підвищення титру специфічних антитіл класу IgG, виділення вірусу в культурі або позитивний результат ЗТ-ПІР [15]. Сироватки при цьому слід отримати якомога раніше після появи перших симптомів захворювання, а повторно – не менш як через 7-14 днів (краще на 14-21-й день).

Антитіла класу IgM можуть не визначатись до п'ятого дня після появи висипань. Виділити ВК у культурі клітин можна в інтервалі між першим та другим тижнем після перших симптомів. Максимальне вірусне навантаження спостерігається на четвертий день після появи

Abbott IMx CMV-IgG та Abbott EIA CMV-IgM наведено з паспортних даних для панелі.

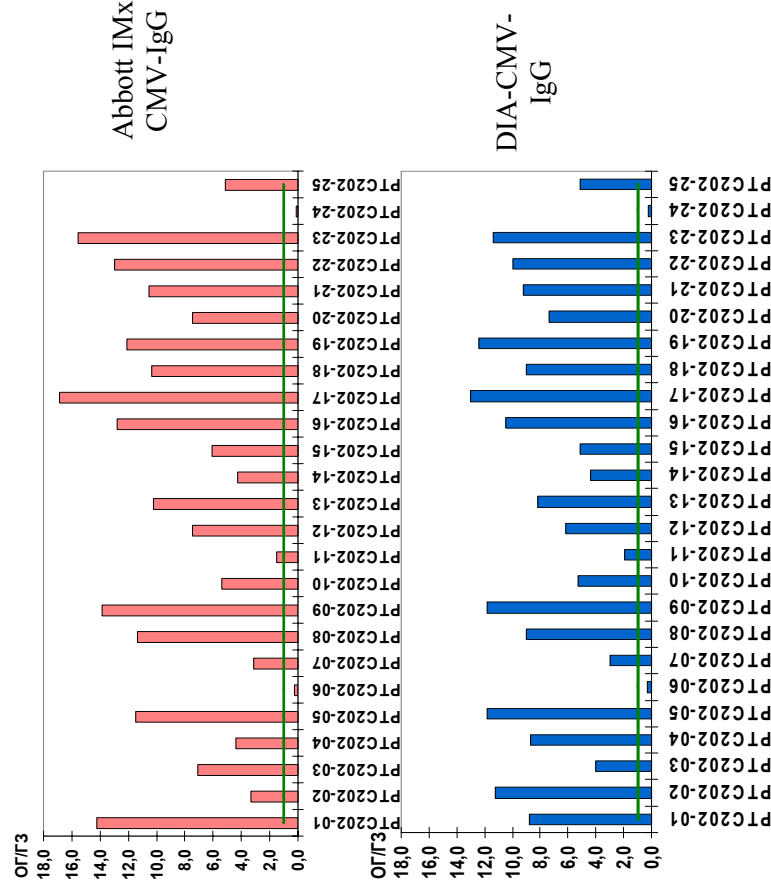


Рис. 6. Оцінка інформативності імуноферментної тест-системи «DIA-CMV-IgG» на зразках панелі Anti-CMV Mixed Titer Performance Panel PTC202 (BBI)

Представлені дані свідчать про те, що при тестуванні панелі PTC202 в тест-системі «DIA-CMV-IgG» всі позитивні зразки були виявлені як позитивні, а негативні – PTC202-06 та PTC202-24 – як негативні.

Як вже зазначалось, при проведенні лабораторних досліджень постає питання про вибір тест-системи. Наукові критерії вибору методу включають визначення чутливості, специфічності та відтворюваності діагностикумів.

Оцінку показників інформативності імуноферментних тест-систем для серологічної діагностики ЦМВІ «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM» проводили з використанням сироваток, отриманих від громадян України та охарактеризованих в аналогічних імуноферментних тест-системах, які застосовуються на території України, а також ряду панелей та контрольних зразків:

- панелі сироваток, що містять антитіла до ЦМВ в різних титрах – anti-CMV Mixed Titer Performance Panel RTC202 виробництва BBI (США). В складі набору 25 зразків сироваток, 2 з яких (RTC202-06 та RTC202-24) – це негативні контролі. До панелі включено також 2 зразки (RTC202-01 та RTC202-05), отримані з проміжком 14 днів від одного донора;
- позитивного контрольного зразка – Assurup 145 CMV IgG Positive Control (BBI, США), який являє собою людську сироватку, що містить антитіла класу IgG до ЦМВ;
- позитивного контрольного зразка – Assurup 146 CMV IgM Positive Control (BBI, США), який являє собою людську сироватку, що містить антитіла класу IgM до ЦМВ;
- негативного контрольного зразка – Assurup 800 TORCH Negative Control (BBI, США), який являє собою людську сироватку, що не містить антитіл до збудників інфекцій TORCH-комплексу (вірусу краснухи, ЦМВ, вірусу простого герпесу, токсоплазм).

При проведенні досліджень позитивні контрольні зразки Assurup 145 та Assurup 146 визначались як позитивні в імуноферментних тест-системах «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM», відповідно. Негативний контроль Assurup 800 в обох тест-системах визначено як негативний. Результати тестування зразків панелі RTC202 в тест-системах «DIA-CMV-IgG» та «DIA-CMV-IgM» у порівнянні з аналогічними тест-наборами, зареєстрованими FDA, представлено на рисунках 6 і 7. Дані тестування панелі RTC202 у діагностикумах

висипань [15]. Тож інформативними для визначення стадії хвороби протягом тривалого часу є імуноферментні дослідження на виявлення специфічних антитіл класів IgG та IgM. Згідно з рекомендаціями ВООЗ щодо нагляду за СВК та краснухою [14], комерційні імуноферментні тести слід використовувати в наступних випадках:

- Для виявлення антитіл класу IgM проти ВК – при діагностиці СВК у новонароджених та гострої краснушної інфекції;
- Для виявлення антитіл класу IgG проти ВК – при визначенні захисного рівня цих антитіл;

Для клінічної практики визначення антитіл класу IgM проти ВК – це один з найінформативніших лабораторних тестів. Визначення цього специфічного маркера краснухи в сироватці крові при наявності клінічних проявів хвороби надійно підтверджує діагноз. Крім того, тест на специфічні антитіла класу IgM проти ВК можна з успіхом використовувати при обстеженні осіб з груп підвищеного ризику, особливо вагітних та дітей. Антитіла класу IgG проти ВК можна вважати ознакою перенесеної краснушної інфекції, бо поява цих антитіл у сироватці крові обстежуваної особи свідчить про закінчення активного інфекційного процесу. До визначення цього серологічного маркера вдаються при епідеміологічних дослідженнях, для виявлення груп ризику серед жінок дітородного віку. Визначення рівня специфічних антитіл класу IgG дає також змогу оцінити напруженість імунітету та прогнозувати можливість розвитку захворювання у випадку реінфекції. У клінічних дослідженнях для встановлення факту інфікування вірусом краснухи визначають специфічні антитіла класу IgG у парних сироватках, отриманих з інтервалом у 10-15 днів.

На підприємстві «Діапроф-Мед» для діагностики краснухи розроблені дві імуноферментні тест-системи – «DIA-Rubella-IgG» та «DIA-Rubella-IgM», що призначені для виявлення специфічних до ВК антитіл класів IgG та IgM, відповідно.

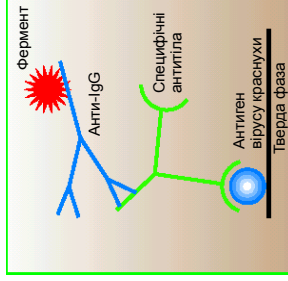


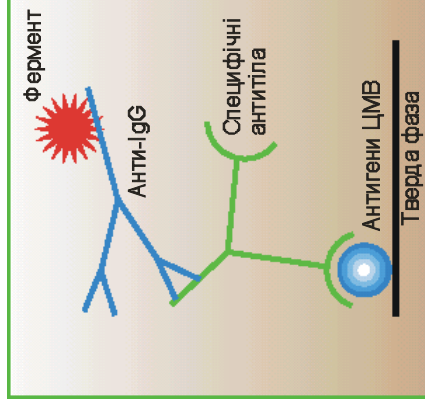
Рис.5. Принципова схема визначення антитіл класу IgG до ВК у тест-системі “DIA-Rubella-IgG”

Схема аналізу при застосуванні тест-набору “DIA-Rubella-IgG” базується на принципі непрямого ІФА, де як імуносорбент використовуються нативний антиген вірусу краснухи, а в складі пероксидазного кон'югату - моноклональні антитіла до імуноглобулінів класу G людини.

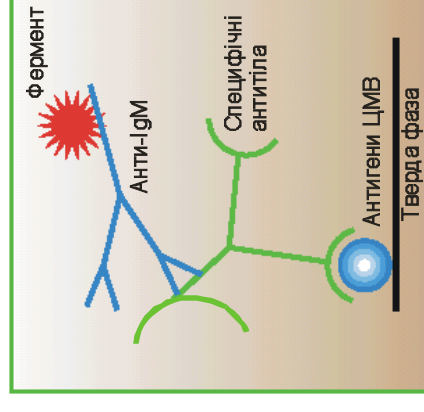
Згідно з рекомендаціями ВООЗ щодо нагляду за СВК та краснухою, з метою стандартизації продуктованих комерційних імуноферментних тест-систем результати досліджень слід виражати в міжнародних одиницях (МО). Граничне значення в тест-системах має складати 10-12 МО/мл, що відповідає рівню специфічних антитіл, які забезпечують захисний імунітет [14]. У тест-системі “DIA-Rubella-IgG” також передбачено кількісний аналіз результатів; граничне значення складає 10-12 МО/мл. Це забезпечується завдяки попередньому титруванню внутрішніх калібраторів тест-набору відносно першого міжнародного стандарту RUBI-1-94.

Характеристика імуноферментних тест-систем “DIA-CMV-IgG” та “DIA-CMV-IgM” для діагностики цитомегаловірусної інфекції

НВК “Діапроф-Мед” розробила та серійно виробляє дві імуноферментні тест-системи для серологічної діагностики ЦМВІ (рис. 4 та 5):



• Рис. 4. „DIA-CMV-IgG” (непрямий варіант ТІФА) – тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgG до цитомегаловірусу людини. У складі імуносорбенту використано рекомбінантні антигени – аналоги білків ЦМВ (p150 та p28). Як кон'югат застосовують МКАТ проти IgG людини, мічені пероксидазою хрому.



• Рис. 5. „DIA-CMV-IgM” (непрямий варіант ТІФА) – тест-система імуноферментна для виявлення антитіл класу IgM до ЦМВ людини. У складі імуносорбенту використано рекомбінантні антигени – аналоги вірусного білку p150. Як кон'югат застосовують МКАТ проти IgM людини, мічені пероксидазою хрому.

внаслідок чого можливі ускладнення після трансплантації та відторгнення пересаджених органів і тканин [22].

Специфічні до ЦМВ антитіла класу IgM у пацієнтів з нормальним імунітетом – це маркери активного перебігу інфекційного процесу при свіжому зараженні або при реактивації персистентної інфекції. Однак у людей з ослабленим імунітетом антитіла класу IgM, специфічні до ЦМВ, не утворюються навіть при клінічно вираженій інфекції. У немовлят виявлення таких антитіл до 2-х тижнів від дня народження свідчить про внутрішньоутробну інфекцію (оскільки материнські IgM не проходять через плаценту), а пізніша поява таких антитіл говорить про інфекцію, набуту після народження [17].

До основних недоліків ТІФА в діагностиці ЦМВІ належить у ряді випадків невідповідність між клінічними проявами хвороби та рівнем антитіл в сироватці крові, що може бути обумовлене особливостями імунної відповіді при даному захворюванні; таке становище часто виникає на фоні імунodefіцітного стану хворого. При визначенні антитіл класу IgM до ЦМВ можливі також хибнопозитивні результати, обумовлені наявністю в сироватці крові ревматоїдного фактора (антитіл класу IgM, специфічних до IgG людини) [26]. Однак таких результатів можна уникнути, додавши Fc-фрагменти та повні імуноглобуліни класу IgG людини, негативної щодо ЦМВ, в розчин для розведення досліджуваних зразків. Крім того, дія ревматоїдного фактора нівелюється при проведенні ІФА, що базується на принципі IgM-„пастки”.

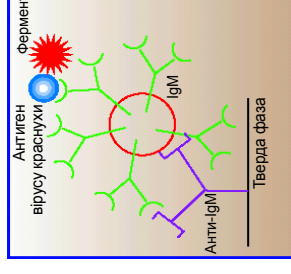


Рис. 6. Принципова схема визначення антитіл класу IgM до ВК у тест-системі “DIA-Rubella-IgM”.

Для виявлення специфічних до ВК антитіл класу IgM розроблено імуноферментну тест-систему “DIA-Rubella-IgM” за принципом IgM-„пастки”; до складу імуносорбенту включено моноклональні антитіла до μ -ланцюга IgM, а до складу кон'югату – очищений антиген ВК, що кон'югований з пероксидазою хрому.

Для оцінки чутливості та специфічності імуноферментних тест-систем “DIA-Rubella-IgG” та “DIA-Rubella-IgM” використали позитивні та негативні контрольні зразки та панель сироваток, що містять антитіла до вірусу краснухи у різних титрах PTR 201 виробництва BBI (США). При аналізі контрольних зразків Accurun 140 Rubella IgG Positive Control, Accurun 141 Rubella IgM Positive Control та Accurun 800 ToRCH Negative Control для обох тест-систем отримано дані, що збігаються з паспортними даними.

На рисунках 7 та 8 подано діаграми оцінки інформативності імуноферментних тест-систем DIA-Rubella-IgG та DIA-Rubella-IgM на зразках панелі Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201 (BBI, США) в порівнянні з тест-системою Abbott Imx Rubella-IgG та Abbott Imx Rubella-IgM, відповідно.

найчастіше використовують непрямий варіант ТІФА. Принцип тестування полягає в тому, що антитіла, присутні в досліджуваному матеріалі, утворюють імунні комплекси з антигенами ЦМВ, сорбованими в лунках полістиролових планшетів. Утворені комплекси виявляють за допомогою антивидових антитіл, мічених ферментом. ТІФА стає більш інформативним при виявленні антитіл до ЦМВ, якщо досліджувані сироватки титрують та аналізують парні сироватки в динаміці захворювання [14].

Виявлення антитіл класу IgG, специфічних до ЦМВ, у раніше серонегативного пацієнта свідчить про первинне зараження. Але більш як 60 % населення при досягненні 20-тирічного віку мають антитіла класу IgG, специфічні до ЦМВ, внаслідок контакту з вірусом [11]. Тому доказом реактивації ЦМВІ може бути тільки 4-х кратне наростання титру специфічних до ЦМВ антитіл класу IgG при дослідженні парних сироваток, взятих з проміжком, не меншим за 10 днів [17]. Визначення специфічних антитіл класу IgG у новонароджених з підозрою на вроджену ЦМВІ ускладнене можливістю материнського походження цих антитіл, що можуть передаватися через плаценту. Ці пасивно отримані антитіла, титри яких не перевищують материнських, звичайно зникають до 6 місяців життя. Імуноглобуліни класу G, синтезовані у відповідь на внутрішньоутробну інфекцію, залишаються триваліший час. При дослідженні материнських та дитячих сироваток, отриманих одночасно, 4-кратне або більше перевищення титру специфічних IgG у немовляти порівняно з матір'ю може вказувати на активну ЦМВІ в дитини [17].

Відсутність антитіл класу IgG, специфічних до ЦМВ, має важливе значення для вагітних та для реципієнтів органів та тканин перед трансплантацією. При первинному інфікуванні в період вагітності, яка характеризується певною імуносупресією, ЦМВІ може набутися тяжких форм, що негативно позначиться як на перебігу вагітності, так і на розвитку плоду внаслідок його внутрішньоутробного інфікування ЦМВ [11].

Організм особи з пересадженим органом чи тканиною не спроможний суттєво протидіяти вірусові як за допомогою специфічних, так і неспецифічних факторів захисту внаслідок імуносупресивної терапії перед трансплантацією. Тому первинне зараження може призвести до розвитку генералізованої ЦМВІ,

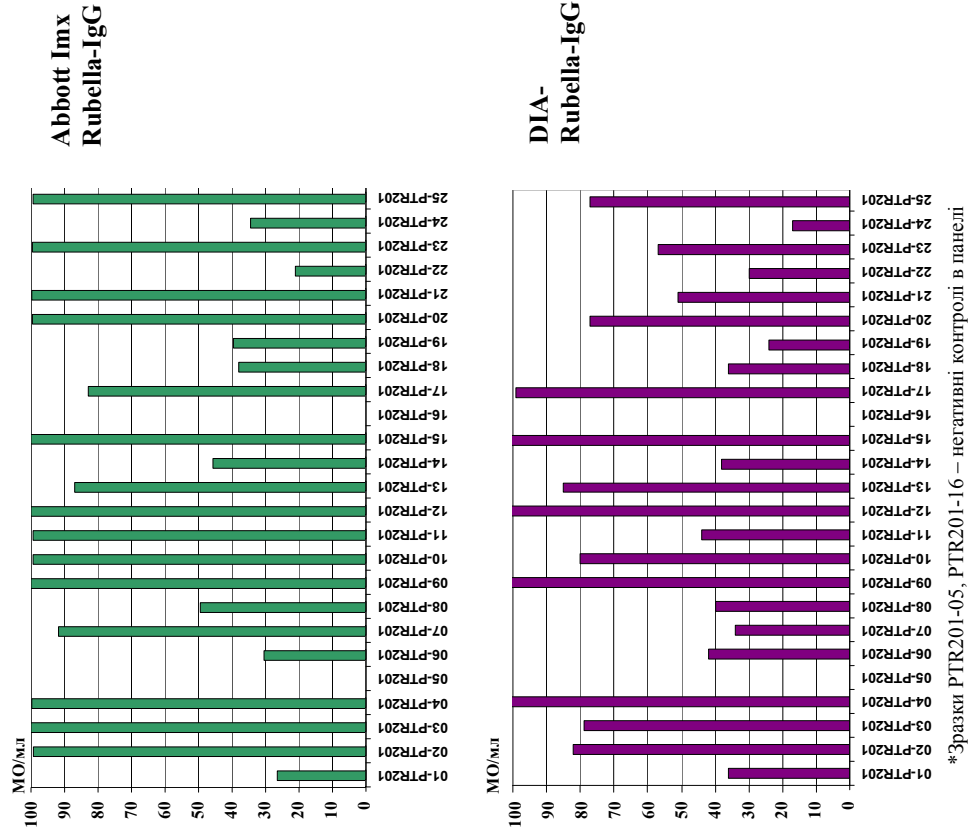


Рис.7. Результати тестувань панелі сироваток Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201 (BBI, США) у тест-системах Abbott Imx Rubella-IgG та DIA-Rubella-IgG

детермінанті певного білку ЦМВ. Однак, незважаючи на високу чутливість та специфічність реакції гібридизації ДНК, вона має істотні недоліки – тривалий час проведення (2-3 доби), складність підготовки проб до дослідження, дорогі реактиви та обладнання [14].

Останнім часом у діагностиці ЦМВІ все ширше використовують високочутливий та специфічний метод детекції вірусу шляхом молекулярної гібридизації та ампліфікації вірусної ДНК – полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), що дає змогу виявляти малі кількості віріонів (менш як 500 копій інфекційного агента в 1 мл). В основі ПЛР лежить ампліфікація специфічних нуклеотидних послідовностей, тобто експоненціальне збільшення кількості копій досліджуваної ДНК. Необхідна умова для проведення ПЛР – знання нуклеотидної послідовності специфічного, притаманного тільки даному вірусові фрагмента ДНК, що підлягає ампліфікації. Результати ПЛР враховуються за допомогою електрофорезу, радіоімунним або імунофлуоресцентним методами в залежності від природи мітки, введеної в зонд. Переваги цього методу – його висока чутливість, специфічність та швидкість дослідження. Але основний недолік ПЛР полягає в низькій його прогностичній цінності, бо ПЛР визначає ДНК як активного ЦМВ, так і вірусу в латентному стані. У таких випадках тільки негативний результат ПЛР має абсолютну діагностичну цінність [6, 16].

До серологічних методів діагностики ЦМВІ належать реакції фіксації комплекменту (РФК), реакція нейтралізації (РН), реакція латексаглютинації (РЛА), реакція пасивної гемаглютинації (РПГА), реакція імунофлуоресценції (РІФ) та імуноблотингу. Останнім часом найбільш розповсюдженим став метод твердофазного імуноферментного аналізу (ТІФА), досить інформативний для диференціації первинної інфекції, реактивації та латентного перебігу ЦМВІ.

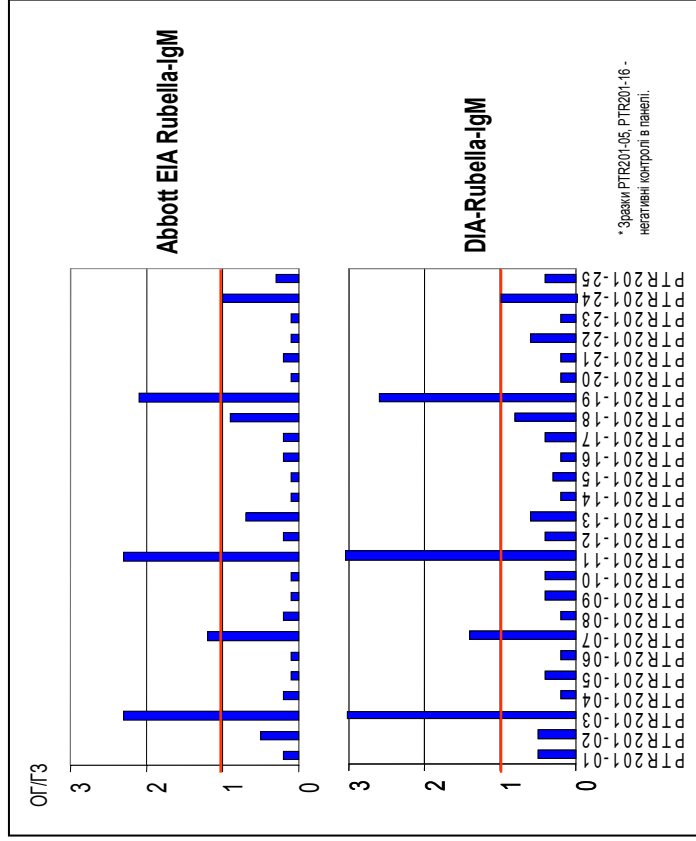
ТІФА також дає змогу виявляти вірусоспецифічні імуноглобуліни з високою та низькою авідністю, що утворюються на початку імунної відповіді при розмноженні вірусу в організмі людини [14]. Як антиген у комерційних тест-системах використовують вірусні часточки, лізат заражених клітин, рекомбінантні білки або синтетичні пептиди [16].

Існує багато модифікацій ТІФА з різноманітними схемами проведення реакції та різними кон'югатами. Для діагностики ЦМВІ

Як видно з рисунку 7, результати тестування зразків панелі PTR201, сироватки містять антитіла до ВК у різних титрах. Сироватки перевірено виробником у тест-системі Abbott Imx Rubella-IgG. Отримані паспортні дані, як видно з даних діаграми, збігаються з результатами, які одержано при тестуванні тих же зразків у тест-системі "DIA-Rubella-IgG". Зразки PTR201-5 та PTR201-16 – негативні контролю панелі.

Аналогічні дослідження з використанням зразків цієї ж панелі проведено і з тест-системою "DIA-Rubella-IgM"; результати показано на рисунку 8. Що стосується тест-наборів для визначення антитіл класу IgM, то для представлених тест-систем теж отримано схожі результати – п'ять сироваток у складі панелі містять специфічні антитіла класу IgM проти ВК, і всі ці сироватки визначено як позитивні в обох тест-наборах.

Рис.8. Результати тестувань панелі сироваток Anti-Rubella Mixed Titer Performance Panel PTR201 (BBI, США) в тест-системах Abbott Imx Rubella-IgM та DIA-Rubella-IgM



Цитологічний метод діагностики ЦМВІ базується на виявленні в досліджуваному матеріалі, зафарбованому азур-еозином або гематоксилін-еозином, специфічно змінених клітин. Ці клітини перетворені на гігантські клітини з великим ядром та вузькою обляміркою цитоплазми (так зване „совине око”). Але діагностична цінність даного методу обмежена низькою чутливістю прижиттєвої діагностики (лише у 30 % дітей з клінічними проявами вродженої ЦМВІ вдається виявити ці клітини) [3, 5].

„Золотим стандартом” для підтвердження прижиттєвого діагнозу ЦМВІ служить вірусологічний метод, оскільки він дає змогу отримати найбільш достовірні результати при гострих проявах хвороби. Вірус виділяють на культурі чутливих клітин – фібробластах та диплоїдних клітинах легень людського ембріона [14]. При генералізованій формі ЦМВІ вірус зв’язується з лейкоцитами, тому для його виділення використовують лейкоцитарні культури. Перепони для повсякденного застосування даного методу – великі затрати праці, необхідність дорогих поживних середовищ та спеціального обладнання для роботи з чутливими культурами клітин.

Для безпосередньої візуалізації ЦМВ протягом багатьох років використовують електронну мікроскопію з негативним контрастуванням вірусних часточок солями фосфорно-вольфрамової кислоти. Але даний метод залишається занадто дорогим та доступним лише в спеціалізованих лабораторіях [20].

Реакція імунофлуоресценції (РІФ) дає змогу виявляти антигени ЦМВ за допомогою кон’югату специфічних антитіл до ЦМВ з флуоресцентним барвником. До різновидів РІФ належить реакція непрямої імунофлуоресценції (РНІФ), де використовуються мічені флуоресцентною мішкою антитіла, специфічні до імуноглобулінів людини. Але оскільки ЦМВІ часто має персистентний перебіг, інфіковані довгі роки можуть виділяти вірус з сечею, спермою, слиною, а тому виявлення вірусу в даних матеріалах не може свідчити про активність інфекційного процесу [14, 16].

До сучасних методів діагностики належить реакція гібридизації ДНК, що дає змогу кількісно оцінити рівень вірусного навантаження, порівнюючи забарвлення проби на фільтрах з забарвленням кількох розведень стандартних препаратів ДНК ЦМВ. ДНК-стандарт і ДНК-зонд представлені рекомбінантною плазмідною ДНК, що містить фрагмент генома ЦМВ, який відповідає типоспецифічній вірусній

можливість передачі збудника при переливанні крові зараженого донора, а також при трансплантації органів та тканин.

ЦМВІ дуже поширена в людській популяції: в Європі, Австралії та Північній Америці рівень інфікованості ЦМВ становить близько 60 % населення; у менш розвинутих країнах рівень інфікованості вищий – до 90–100 %. Рівень інфікування дітей у розвинених країнах складає 8–35 %, а в країнах, що розвиваються – 42–55 % [18] (рис.3).

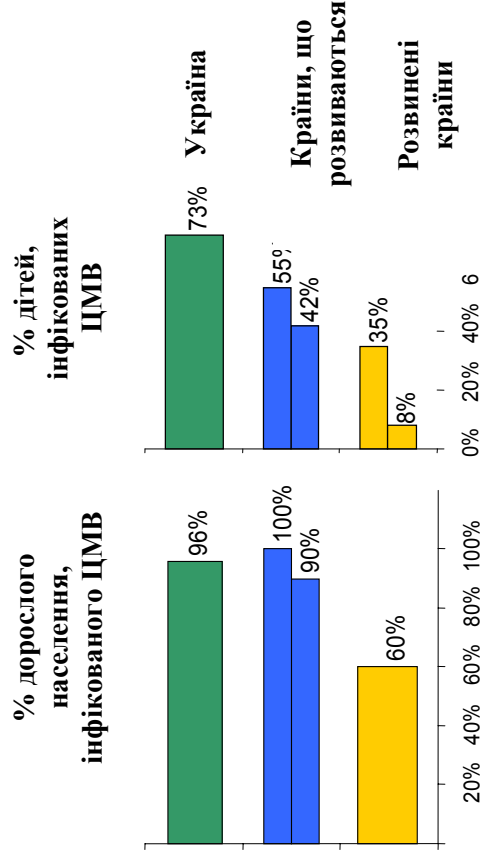


Рис.3. Поширеність цитомегаловірусної інфекції

Лабораторна діагностика ЦМВІ

Як уже зазначалось, ЦМВІ часто має безсимптомний перебіг або її клінічні прояви не специфічні. Вважають, що вірогідність діагностики ЦМВІ лише за клінічними даними не перевищує 10 % [8]. Для лабораторного підтвердження ЦМВІ використовують цитологічний, вірусологічний, серологічні методи (реакція імунофлуоресценції, імуноферментний аналіз, імуноблотинг тощо), а також методи визначення вірусної нуклеїнової кислоти.

Імуноферментні тест-системи для визначення специфічних антитіл класів IgM та IgG можна використовувати як для діагностики краснухи, так і для оцінки напруженості імунітету. З метою вивчення напруженості імунітету проти краснухи в різних вікових групах населення ми визначали рівень специфічних антитіл класу IgG в сироватках крові донорів (495 зразків), вагітних (157 зразків) та дітей віком від трьох до семи років (150 зразків) з використанням тест-системи “DIA-Rubella-IgG”. Слід відзначити, що не завжди концентрація специфічних антитіл проти ВК на рівні 10–12 МО/мл забезпечує захисну реакцію організму. За літературними даними [10], є випадки зараження вакцинованих осіб з низьким рівнем специфічних антитіл (10–20 МО/мл). Крім того, ревакцинація осіб з рівнем антитіл проти ВК, нижчим за 15 МО/мл, призводить до формування первинної імунної відповіді (з наступним синтезом IgM та низькоавідних IgG), а імунна відповідь при ревакцинації осіб з рівнем специфічних IgG > 15 МО/мл являє собою бустерну реакцію (викликає синтез високоавідних специфічних IgG) [13]. Тому в наших дослідженнях було виділено три категорії осіб – незахищені (<10 МО), відносно захищені (10–20 МО) та особи з середнім та високим рівнем захисних антитіл – >20 МО.

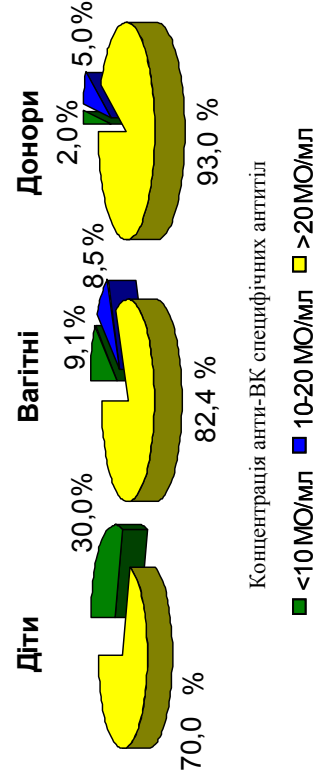


Рис.9. Вивчення протективного імунітету проти краснухи в різних вікових групах населення

Згідно з отриманими результатами (рис. 9), серед дітей виявлено найбільшу кількість осіб (30 %), не захищених від краснухи. В той же час саме серед цієї групи не було виявлено осіб з низьким рівнем захисних антитіл. Причина може полягати в дієвості імунної відповіді в дітей, які хворіли на краснуху у віці 3-7 років.

Що стосується дорослої групи – вагітних та донорів, то кількість незахищених осіб тут набагато менша – 9,1 % та 2 %, відповідно. Крім того, у цій групі зустрічаються особи з низьким рівнем специфічних антитіл, що можна пояснити поступовим зниженням рівня специфічних антитіл після первинного інфікування. Безумовно, неабиякий інтерес представляють подібні дослідження серед дітей, щеплених проти краснухи, та дорослих осіб, щоб оцінити стан захисного імунітету після вакцинації та тривалості його дії.

падає, але, на відміну від антитіл класу IgM, антитіла класу IgG зберігаються в крові протягом усього життя. Реактивация інфекції викликає наростання титру антитіл класу IgG. При цьому підвищується й титр IgM, але не до такого рівня, як при первинному зараженні [7].

У імунокомпетентних осіб відбувається поступове знищення ЦМВ. Але у випадках порушення імунореактивності відповідь імунної системи на вірус загальмовується. У процесі дозрівання Т- та В-лімфоцитів антигени вірусу зв'язуються зі специфічними рецепторами цих клітин, порушуючи процеси розпізнавання вірусних часточок та вилучаючи лімфоцити, необхідні для розвитку імунної відповіді на вірус. У результаті порушується передача сигналів, що призводить до дефіциту антитіл, специфічних до ЦМВ, та цитотоксичних лімфоцитів. Крім того, протівірусний імунітет втрачає дієвість через недостатність системи інтерферону, пригнічення функцій макрофагів та природних клітин-кілерів. Зниження клітинної та гуморальної імунної відповіді при ЦМВІ може стати причиною рецидивів бактеріальних інфекцій. У ряді випадків при ЦМВІ настає стійке порушення співвідношення поміж імунорегуляторними клітинами CD^{4+} та CD^{8+} за рахунок зниження CD^{4+} [24].

Епідеміологія

Джерело ЦМВІ – хвора людина чи вірусоносії. Хворий виділяє вірус практично з усіма біологічними рідинами та секретами – слиною, молоком, сечею; ЦМВ міститься у цервікальному та вагінальному секретах, спермі, крові та лікворі. ЦМВ, іноді у високих концентраціях, виявляють протягом тривалого часу (іноді декількох років) у слині та сечі вірусоносіїв [2].

Способи виділювання ЦМВ у довкілля визначають численні шляхи його передачі: контактний, статевий, повітряно-крапельний шляхи; можлива вертикальна передача інфекції від матері до плоду. Контактний шлях передачі виникає при потрапленні вірусу на uszkodжену шкіру чи слизові оболонки. Зараження може відбуватися статевим шляхом при наявності ЦМВ у спермі чи секретах цервікального каналу. Важливе епідемічне значення належить передачі ЦМВ від інфікованої матері до дитини при внутрішньоутробному та постнатальному зараженні. Доведено

В залежності від патогенезу та клінічних проявів ЦМВІ розрізняють її вроджену та набуту форми. Набута ЦМВІ у 90 % імунотокметентних дорослих перебігає субклінічно в латентній формі [24]. Найчастішим проявом набуті ЦМВІ є мононуклеозоподібний синдром, симптомокомплекс якого включає слабкість, головний біль, лихоманку, гепатомегалію. Прогноз у даному випадку звичайно сприятливий, хоча іноді деякі симптоми можуть не проходити протягом декількох тижнів [17].

Генералізована інфекція з тяжкими пошкодженнями легень, шлунково-кишкового тракту, центральної нервової системи, ендокринних залоз, шкіри та слизових оболонок спостерігається в хворих з імунітетом, ослабленим внаслідок хіміотерапії, пересадки органів, СНІДу тощо [6]. Поява у хворих ретиніту свідчить про тяжку імуносупресію, оскільки характерний для вродженої ЦМВІ ретиніт постнатально зустрічається дуже рідко [17].

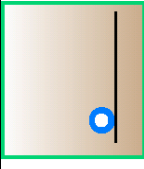
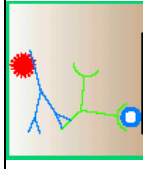
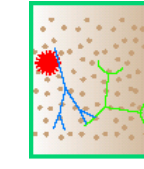
Уроджена ЦМВІ в дітей може виникати внаслідок первинного інфікування чи рецидивної інфекції в матері під час вагітності. Первинне інфікування матері більш вірогідно веде до зараження плоду, ніж рецидиви. При первинному інфікуванні вагітної ризик передачі вірусу до плоду складає 40-50 %; специфічні ознаки такого зараження плоду – пошкодження ЦНС, внутрішнього вуха, судинної оболонки ока та печінки. За сучасними даними, близько 10 % дітей з симптомами ЦМВІ на момент народження гинуть протягом перших місяців життя. Розумова відсталість та сенсорно-невральна глухота спостерігаються у 45-90 % дітей, що мали симптоми ЦМВІ на момент народження, та в 10-20 % дітей без ознак цієї інфекції при народженні. В подальшому у більшості випадків спостерігають поступову втрату слуху та зору, а іноді й пошкодження мозку [10, 17].

ЦМВІ належить до латентних інфекцій; внаслідок довготривалої персистенції в організмі вірус впливає на всі ланки імунної системи хворого. Проте імунітет, що при цьому формується, нестійкий. Захищена відповідь організму супроводиться синтезом специфічних антитіл, активацією цитотоксичних реакцій, розвитком реакцій гіперчутливості уповільненого типу [12].

При первинному інфікуванні утворюється велика кількість антитіл класу IgM, які циркулюють у крові протягом 4-18 тижнів від початку інфекції. У ході розвитку імунної відповіді титр IgM знижується, але при цьому значно зростає титр IgG. Далі рівень IgG

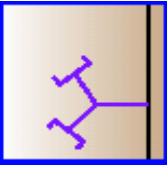
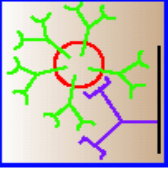
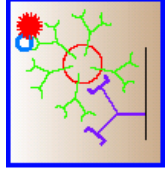
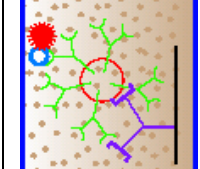
DIA-Rubella-IgG

Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibilізовані антигеном вірусу краснухи	
- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл зразків контролів та сироваток, розведених 1:50 - Інкубація протягом 30 хв при 37 °C (формування комплексу антиген-антитіло) - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - Інкубація протягом 30 хв при 37 °C (формування комплексу з кон'югатом) - Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню з ТМБ - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) - Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту - Реєстрація оптичної густини	

DIA-Rubella-IgM

Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibiлізовані моноклональними антитiлами до iмунoглобулінів класу IgM	
- Внесення в лунки стрипів по 100 мкл зразків контролів та сироваток, розведених 1:50 - Інкубація протягом 30 хв при 37 °C - Промивання лунок буферним розчином 4 рази	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину кон'югату - Інкубація протягом 30 хв при 37 °C (формування комплексу з кон'югатом) - Промивання лунок буферним розчином 6 разів	
- Внесення в лунки по 100 мкл розчину перекису водню з ТМБ - Інкубація протягом 30 хв при кімнатній температурі (забарвлення) - Зупинка реакції додаванням стоп-реагенту - Реєстрація оптичної густини	

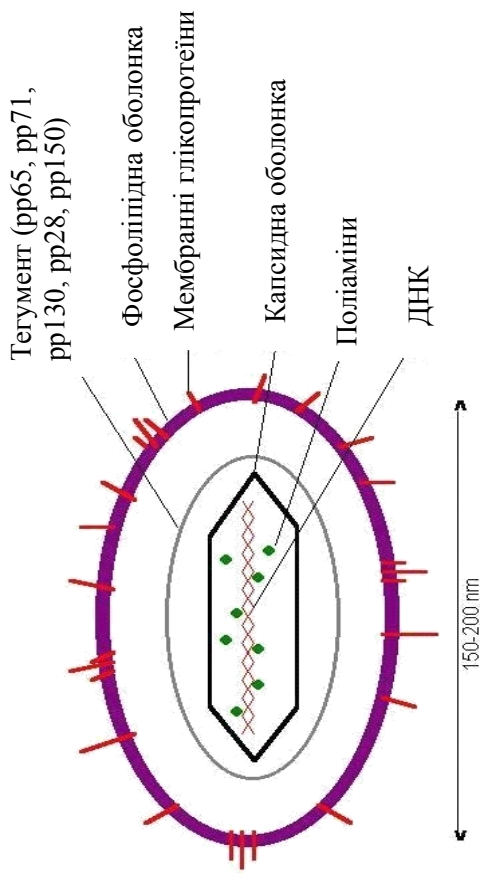


Рис. 2. Структура цитомегаловірусу

У залежності від генетичних особливостей, стану імунної системи на момент зараження, віку людини, а також шляхів зараження, можливі різні механізми розвитку ЦМВІ. В імунокомпетентних осіб ЦМВ може тривалий час перебувати в стані персистенції або слабо розмножуватись без виражених клінічних проявів. При імунодефіцитних станах, викликаних вагітністю, впливом цитостатиків, при трансплантації органів, променевої хвороби, пухлинах, СНДі та стресах відбувається реактивація цитомегаловірусу, внаслідок чого вірус виходить у кров та розноситься по організму, викликаючи гострі інфекції.

Генералізація інфекційного процесу відбувається і при первинному проникненні ЦМВ в організм через кров, на відміну від інших шляхів інфікування, які призводять переважно до латентного перебігу інфекції [23]. Трансплацентарна передача ЦМВ, що призводить до формування вродженої ЦМВІ, відбувається при довготривалій та вираженій вірусемії, а також при синдромі недостатності плаценти. Це може викликати загинел ь плоду (при враженні ЦМВ на ранніх стадіях вагітності) та розвиток вроджених вад (при враженні на більш пізніх стадіях вагітності) [17].

імунного статусу інфікованої особи, до тератогенної та онкогенної дії; активації ряду герпетичних та інших супутніх інфекцій.

Клітини-мішені ЦМВ в організмі людини – лімфоцити, моноцити, епітеліальні клітини слинних залоз, дихальних шляхів, нирок, статевих шляхів. Розвиток цитопатичного ефекту в результаті розмноження ЦМВ в цих клітинах відбувається протягом 7-40 діб. При цьому вражена клітина збільшується в розмірах, в її ядрі утворюються великі вclusions, які являють собою незрілі віріони, а в цитоплазмі – численні вclusions у формі півмісяця (рис.1.) [17].

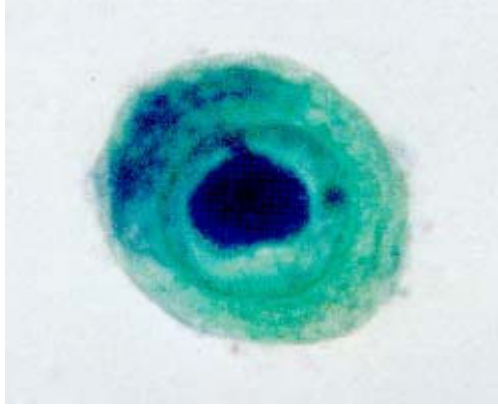


Рис.1. Клітина, уражена цитомегаловірусом – „совине око”.

При світловій мікроскопії такі клітини нагадують „совине око”. Базофілія внутрішньоядерних вclusions, наявність цитоплазматичних вclusions та збільшення розмірів клітини (цитомегалія) – основні диференційні ознаки клітин, інфікованих цитомегаловірусом [9].

З літературних даних відомо, що найвища імуногенність притаманна внутрішнім білкам ЦМВ – pp150, pp28 та pp65 [19, 21]. Це обумовлює широке застосування саме цих вірусних антигенів у серологічній діагностиці ЦМВІ (рис. 2).

Література

1. Букринская А.Г. Вирусология. – М.: Медицина. – 1986. – 336 с.
2. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. – Т.3. – К.: ”Здоров’я” – 2002. – с.819-839.
3. Деревянкін І.В. Епідеміологічні особливості краснухи в Україні. Автореферат дис. канд. мед. наук – Київ. – 1997 – 17 с.
4. Деревянкін І.В., Чудна Л.М. Роль краснушної інфекції в перинатальній патології в Україні. // Медицинские вести. – 1997. – № 3 – С. 11-12.
5. Семенов В.М. Краснушная инфекция: эпидемиология, клинико-иммунопатогенетические особенности, диагностика. Автореферат дис. докт. мед. наук – Киев, 1990 – 46 с.
6. Чудная Л.М., Деревянкін І.В., Красюк Л.С. и др. Эпидемиология и профилактика краснухи // Сучасні інфекції. – 2000 – № 3 – с. 108-111.
7. CDC. Control and prevention of rubella: evaluation and management of suspected outbreaks, rubella in pregnant women, and surveillance for congenital rubella syndrome. – MMWR. – 2001 – 30 p.
8. Extract of Regional Committee Document of Health 21. EUR/RC48/10.
9. Knox E.G. Theoretical aspects of rubella vaccination// Rev. Infect. Dis. – 1985 – V.7. – P. 194-197
10. O'Shea S., Corbett K.M., Barrow S.M., et. al. Rubella reinfection; role of neutralising antibodies and cell-mediated immunity// Clin. Diagn. Virol. - 1994. – V.2 – P. 349-358
11. Panagiotopoulos T., Antoniadou I., Valassi-Adam E. Increase in congenital rubella occurrence after immunisation in Greece: retrospective survey and systematic review// BMJ. – 1999. – V.319 – P.1462-1466
12. Robertson S.E., Cutts F.T., Samuel R., Dias-Ortega J-L. Control of rubella congenital syndrome (CRS) in developing countries. Part 2: vaccination against rubella// Bull. WHO. – 1997. – V.75. – P. 69-80
13. Tischer A., Gerike E. Immune response after primary and revaccination with different combined vaccines against measles, mumps, rubella// Vaccine. – 2000. – V.18 – P. 1382-1392

14. WHO. Guidelines for surveillance of CRS and Rubella. // WHO, 1999. – 92 p.

15. Zimmerman L. Chapter 11: Rubella // VPD Surveillance Manual, 3rd edition. – 2002 – P. 11.1 – 11.12

ЦИТОМЕГАЛОВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ

Цитомегаловірусна інфекція (ЦМВІ) – вірусне інфекційне захворювання людини, що перебігає у субклінічних чи клінічних формах з локальними чи поліорганными ураженнями; рецидиви хвороби обумовлені пожиттєвим переживанням вірусу в інфікованому організмі [2]. У більшості випадків перебіг ЦМВІ безсимптомний. Клінічні прояви цитомегаловірусної інфекції спостерігаються за умов імунної недостатності, що виникає внаслідок ВІЛ-інфекції, хіміотерапії при онкологічних процесах, імуносупресивної терапії при пересадженні органів та тканин тощо [1]. ЦМВІ у вагітних може призводити до внутрішньоутробного інфікування плоду та акушерської патології [13]. Тому необхідна своєчасна лабораторна діагностика ЦМВІ, яка набуває вирішального значення перед пересадженням органів та на етапі планування вагітності. Отримані лабораторні дані допомагають правильно обрати стратегію лікування пацієнтів з основними захворюваннями, при яких ЦМВІ виступає як опортуністична інфекція, а також у випадках „самостійної” ЦМВІ.

ЦМВІ дуже поширена в людській популяції. В залежності від регіону та соціально-культурного рівня людей від 50 до 100 % дорослого населення інфіковано цитомегаловірусом (ЦМВ).

Зараженість дітей, які відвідують дитячі дошкільні заклади, складає 50 %. З урахуванням віку та широти контактів між людьми, виділяють дві хвили інфікування ЦМВ: перша припадає на вік від народження до трьох років, друга – на період статевого дозрівання [17].

Етіологія та патогенез

Збудник ЦМВІ – ДНК-вмісний вірус (150-200 нм) роду *Cytomegalovirus* (вид *C. hominis*), який належить до родини *Herpesviridae*. ЦМВ добре зберігається при кімнатній температурі, чутливий до ефіру, розчинів для дезінфекції; швидко руйнується при нагріванні. ЦМВ характеризується низькою вірулентністю та вираженою здатністю різко пригнічувати клітинний імунітет [8, 15].

Найбільше значення у розвитку патологічного процесу належить: здатності ЦМВ до тривалого (пожиттєвого) переживання в клітині; зміні латентної стадії інфекції на фазу репродукції вірусу та загостренню процесу з хронічним перебігом; схильності до порушення