

Решение задачи повышения специфичности современных тест-систем для диагностики ToRCH-инфекций на примере IgM CMV

С. С. Васькова, К.М.Н., гл. врач

СПб ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр (вирусологический)», г. Санкт-Петербург

Increasing specificity of modern test-systems for diagnosis of ToRCH-infections on example of IgM CMV

S.S. Vashukova

City Consultative and Diagnostic Center (virological), Saint Petersburg, Russia

Резюме

Цель исследования. Обосновать формат тестов для лабораторной диагностики ToRCH-инфекций, выявить причины недостаточной чувствительности и специфичности иммуноферментных тестов на примере определения иммуноглобулинов класса М против цитомегаловируса, предложить способы решения. Выводы. Метод «мю-захвата» решает проблему специфичности, а вариант последовательных инкубаций с конъюгатами — первая с биотином, вторая со стрептавидином — усиливает сигнал путем увеличения числа ковалентных связей, что повышает чувствительность теста.

Ключевые слова: ToRCH-инфекции, иммуноглобулины класса М (IgM), цитомегаловирусная инфекция, capture-метод захвата, конъюгат биотин, конъюгат стрептавидин.

Summary

The aim of the study was to substantiate the format of tests for laboratory diagnosis of ToRCH-infections, to identify the causes of insufficient sensitivity and specificity of the ELISA tests on the example of determination of immunoglobulin M against cytomegalovirus, and to offer the solutions. Conclusions. The method of mu-capture solves the problem of specificity, and the variant of sequential incubation with conjugates — the first incubation with Biotin, the second with streptavidin — enhances the signal by increasing the number of covalent bonds, which increases the sensitivity of the test.

Key words: ToRCH-infections, M-class immunoglobulins (IgM), cytomegalovirus infection, capture- method, conjugate biotin, conjugate streptavidin.

Внутриутробные инфекции (ВУИ) — это инфекционные заболевания эмбриона, плода и новорожденного, заражение которыми происходит внутриутробно, и путь передачи ВУИ всегда вертикальный — от матери к плоду.

Возбудителями ВУИ могут быть вирусы, бактерии, реже — паразиты. Результатом инфицирования могут быть гибель плода, выкидыш, врожденные пороки развития или острый инфекционный процесс у новорожденного. Нередко, если нет четкого этиологического диагноза, но есть отклонения в развитии новорожденного, говорят о ToRCH-синдроме.

В 1971 году Всемирная организация здравоохранения из всего перечня ВУИ выделила четыре инфекции, и собирательный термин ToRCH получил название по этим четырем возбудителям ВУИ:

- Т — *Toxoplasma gondii*;
- R — *Rubella*;
- С — *Cytomegalovirus*;
- Н — *Herpes simplex virus*.

ToRCH-инфекции были выделены в отдельную группу по следующим признакам.

1. Трансплацентарное заражение плода при первичной инфекции или при реактивации латентной вторичной инфекции (в частности, цитомегалии, герпетической инфекции), которое вызвано изменением иммунитета при беременности.
2. Тератогенное действие на плод зависит от срока беременности: чем меньше срок беременности, на котором произошло инфицирование, тем больше риск заражения и тяжелее степень поражения плода. В I триместре беременности возникают тяжелые пороки развития или гибель плода, во II–III триместрах — множественные поражения органов плода, приводящие к инвалидизации ребенка.
3. Клинические проявления ToRCH-инфекций: микроцефалия, гидроцефалия, хориоретинит, глухота, катаракта, пороки сердца, кожные поражения, скелетно-мышечные нарушения, что отличает ToRCH-инфекции от других ВУИ.

Сегодня основные проявления врожденной краснухи известны как триада Грега: поражения глаз,

глухота, дефекты развития сердечно-сосудистой системы.

Сходство клинических проявлений ToRCH-синдрома у плода исключает возможность постановки диагноза только на основании клинической картины, в связи с чем возрастает роль специфической лабораторной диагностики. Программа скрининга и ведения беременных при ToRCH-инфекциях отличается от других ВУИ.

Для российского здравоохранения ToRCH-инфекции, как наиболее значимые причины смерти детей в неонатальном периоде и инвалидизации детей, важны и обозначены законодательно: диагностика ToRCH-инфекций представлена широко во всех государственных лабораториях РФ.

Основным скрининговым методом диагностики ToRCH-инфекций на сегодняшний день является иммуноферментный анализ (ИФА), а в качестве дополнительных методов используют иммуноблот и ПЦР.

ИФА ToRCH-инфекций определяет наличие антител и степень их созревания. Сила иммунного ответа при любой инфекции нарастает постепенно, поэтапно вовлекая каждый

из компонентов иммунной системы на определенной стадии заболевания. Выявив активность отдельного звена иммунитета, можно судить о давности инфицирования. Первыми образуются IgM-антитела, затем присоединяются IgA, Ig G. Постепенно начинают преобладать IgG-антитела. Своего пика количество IgG-антител в крови достигает приблизительно за неделю, держится 1–3 месяца, затем медленно снижается.

При повторном поступлении антигена в организм выработка антител происходит быстрее и в большем объеме, при этом образуются сразу IgG-антитела. Иммунная система способна запоминать свои встречи с некоторыми антигенами очень надолго, этим объясняется, например, пожизненный иммунитет к токсоплазмозу и краснухе.

IgG-антитела, проникающие через плаценту, которые обнаруживаются в крови новорожденного, по происхождению материнские. IgM-антитела не проникают через плаценту; если они определяются в крови новорожденного, то они его собственные. В таком случае думают об острой инфекции у ребенка. Это важный тест: присутствие антигенспецифических IgM дает возможность первично выявить период острой фазы. Поэтому определяют одновременно наличие IgG- и IgM-антител у беременных женщин на весь комплекс ToRCH-инфекций, и при наличии IgM-антител подтверждают их, а при обнаружении антител класса IgG определяют их количество и смотрят на показатель avidности. Уровень avidности IgG пропорционален дозе и природе антигена, а также индивидуальному уровню соматических мутаций. Низкие дозы антигена приводят к более быстрому возрастанию avidности, а высокие дозы — более медленному. Таким образом, низкоавидные антитела продуцируются в течение первой стадии инфекции, когда содержание антигенов обычно высокое.

Остановимся более подробно на тест-системе для определения IgM-антител. Это самый сложный в исполнении тест.

Лаборатории сталкиваются на практике с двумя проблемами: много ложноположительных (число доходит до десяти с планшета) результатов, а также встречаются ложноотрицательные.

Рассмотрим возможные причины низкой чувствительности и специфичности на примере IgM против цитомегаловируса (IgM ЦМВ).

Прежде всего специфичность снижают иммуноглобулины класса G (IgG). IgG после перенесенной (латентной) инфекции могут успешно конкурировать за антиген с IgM, образовавшимся в ответ на новую инфекцию (IgG меньшего размера, чем IgM). Также специфичность ограничивает ревматоидный фактор (РФ). В «сэндвиче» РФ может образовать схожий комплекс.

Третьей причиной понижения специфичности традиционно считаются перекрестные реакции. Вирус герпеса (HSV) и вирус Эпштейна-Барра эволюционно родственны ЦМВ и имеют с ним множественные общие антигенные детерминанты [Чарльз Ли, Мина Гадеши, Деннис Састерсик, Рома Леви «Использование разных форматов методов серологического определения антиген-специфического IgM при диагностике инфекционных заболеваний», 2005].

Для получения точных результатов причины возникновения низкой специфичности должны быть исключены.

Одним из обязательных условий наиболее полного выделения IgM является *capture*-метод (μ -захват). Безусловно, если лаборатория в предложениях поставщиков видит как альтернативный метод определения IgM-*capture*, то выбор тест-системы в его пользу.

И это вполне обоснованно. Суть *capture*-метода состоит в том, что в качестве иммуносорбента в лунки планшета нанесены не обычные антигены, а антитела против μ -цепей Ig M.

Такие антитела высокоспецифичны к IgM, поскольку ориентированы на консервативный район тяжелой μ -цепи Ig M. Конкурирующие IgG и ревматоидный фактор не могут выявляться этим методом, поскольку аминокислотная последовательность консервативного района тяжелой Y-цепи РФ отличается от аналогичной последовательности μ -цепи Ig M.

Исключить перекрестные реакции, возникающие преимущественно из-за наличия в сыворотке родственных цитомегаловирусу герпесвирусов (вирус Эпштейна-Барр, вирус ветряной оспы, вирус простого герпеса) позволяют конъюгированные антигены ЦМВ, ко-

торые также участвуют в образовании сэндвича. Специфический антиген входит в состав конъюгатов российских и зарубежных разработчиков. Однако наиболее полно решить проблему перекрестных инфекций позволяет решить лиофилизат антигена, который непосредственно перед инкубацией вносится в биотилированный конъюгат.

Пример такого решения удачно воспроизведен в тест-системе бренда Radim (владелец РУ РФ ГК «Алкор Био»), и это отражается на повышении специфичности. Диагностическая специфичность тест-системы «Цитомегаловирус IgM» Radim составляет 100 %, в представленном методе отсутствует влияние ревматоидного фактора и IgM других вирусов герпеса (вируса Эпштейна-Барр, вируса ветряной оспы и вируса простого герпеса).

Постановка теста в такой модификации полностью избавляет от ложноположительных результатов.

Обращая еще раз внимание на сложность определения IgM, и акцентируя его на специфичности, не нужно забывать о чувствительности, вернее, о балансе между чувствительностью и специфичностью. Те же отдельные IgG меньшего размера, конкурируя с антигенспецифическими IgM за место связывания, увеличивают шанс пропустить Ig M.

Часто на практике *capture*-метод обеспечивает высокую специфичность, но не во всех тест-системах дает оптимальную чувствительность.

В последнее время в лабораторной диагностике существует модный тренд: короткое время постановки теста. Действительно, российские производители конкурируют между собой за общее время инкубаций. Если это не сказывается на качестве тестов, то это вполне понятно и приветствуется лабораториями. Но в некоторых тестах, в частности, ЦМВ IgM, в погоне за коротким временем постановки страдает чувствительность.

Установлено, что многостадийность вообще положительно влияет на чувствительность: двух- и более стадийные наборы обладают лучшими диагностическими характеристиками.

Обращаясь к классике, хочется рассмотреть именно варианты инкубаций с конъюгатами более подробно.

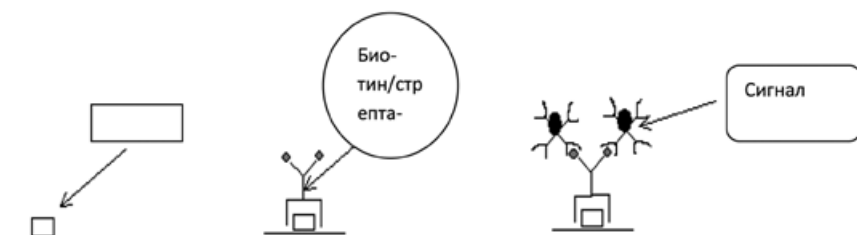


Рисунок 1. Инкубация с одним конъюгатом: биотин / стрептавидин.



Рисунок 2. Две последовательные инкубации с двумя конъюгатами.

Таблица 1
Результаты исследований на краснуху методом ИФА тест-систем формата RADIM в 2015–2016 годах

Обследовано человек	Обнаружено	
	Абс. число	Процент
Всего 1703		
IgM-антитела, 1703	1	0,05
IgG-антитела, 1097	981	89,40
В т.ч. беременных 213		
IgM-антитела, 213	0 (20?)	0 (9,4%)
IgG-антитела, 118	100	84,70
В т.ч. детей 1490		
IgM-антитела, 1490	0	0
IgG-антитела, 269	227	84,30

Таблица 2
Результаты исследований на TORCH-инфекции новорожденных детей ДГБ № 17 в 2015–2016 годах

Наименование инфекции	Обследовано	Обнаружено	
		Абс. число	Процент
Токсоплазмоз, IgM	816	1	0,1
Токсоплазмоз, IgG	550	181	32,9
Краснуха, IgM	604	0	0
Краснуха, IgG	368	232	63,0
Цитомегалия, IgM	911	11	1,2
Цитомегалия, IgG	812	638	78,6
Герпес простой, IgM	555	5	0,9
Герпес простой IgG	410	348	84,9

В качестве конъюгата используется систему «биотин / стрептавидин», основанную на высоком родстве этих компонентов. Биотин — низкомолекулярный растворимый витамин, стрептавидин — бактериальный белок. Система «биотин / стрептавидин» (БС) дает дополнительные участки связывания и используется в реагентах как для закрытых автоматических ана-

лизаторов (фирм Roche, Abbott и др.), а также всех открытых у всех российских и зарубежных производителей.

На рис. 1 и 2 представлены два варианта инкубаций с конъюгатами: одна инкубация с одним конъюгатом (биотин / стрептавидин) и две последовательные инкубации с двумя конъюгатами (вначале с биотином, затем со стрептавидином).

Видно значительное увеличение ковалентных связей на рис. 2, что ведет к усилению сигнала, то есть значительному повышению чувствительности теста (Н. Кузьмина, «Моноклональные антитела»).

Две последовательные инкубации с двумя конъюгатами (с биотином, а затем со стрептавидином) представлены в тест-системах IgM ToRCH-инфекций бренда Radim. Благодаря многостадийности постановки тесты Radim обладают высокой чувствительностью.

Тест-системы бренда Radim на протяжении многих лет используются крупными диагностическими лабораториями Санкт-Петербурга, экспертными лабораториями. Статистические данные СПб ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр (вирусологический)».

У 20 обследованных на IgM-антитела ранее выявленные ложноположительные результаты после постановки на тест-системах бренда Radim были сняты даже по краснухе (в табл. под знаком вопроса).

Заключение

Множественные варианты формата анализа, основанного на связывании и детекции антител класса IgM ToRCH-инфекций (в том числе цитомегаловирусной инфекции) могут быть скомбинированы в различные методики для повышения достоверности результата. В конечном итоге формат теста зависит от разнообразных факторов, влияющих на специфичность и чувствительность. И хотя теоретически можно обосновать то, что кажется лучшим выбором, определение наиболее эффективного метода нужно поручить практике. Тест, оптимально соответствующий требованиям высокой чувствительности и специфичности, может применяться на практике в соответствии с общей клинической картиной для достижения точного результата.

Список литературы

1. Н. Кузьмина. Моноклональные антитела. 1995–2013.
2. Ч. Ли, М. Гадеши, Д. Састерсик, Р. Леви. Использование разных форматов методов серологического определения антиген-специфического IgM при диагностике инфекционных заболеваний. 2005.