

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц
2015 г.

Регистрационный № 158-1115

**АЛГОРИТМЫ
КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ
(краснуха, парвовирусная инфекция, цитомегаловирусная инфекция,
ветряная оспа)**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ:

к.м.н. Ермолович М.А.; д.м.н., профессор Самойлович Е.О.;
к.м.н. Артюшевская М.В.; д.м.н., профессор Шишко Г.А.; Леонова Е.Ю.;
к.м.н. Козлякова О.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

23.12.2015

Регистрационный № 158-1115

**АЛГОРИТМЫ
КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ И НОВОРОЖДЕННЫХ
(краснуха, парвовирусная инфекция, цитомегаловирусная инфекция,
ветряная оспа)**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук М.А. Ермолович, д-р мед. наук, проф. Е.О. Самойлович, канд. мед. наук М.В. Артюшевская, д-р мед. наук, проф. Г.А. Шишко, Е.Ю. Леонова, канд. мед. наук О.В. Козлякова

Минск 2015

Настоящая Инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для врачей-специалистов: врачей-акушеров-гинекологов, врачей-неонатологов стационаров III и IV уровней оказания специализированной перинатальной помощи, врачей-лаборантов, а также может быть использована лечебно-профилактическими учреждениями независимо от организационно-правовой формы, осуществляющими клинико-лабораторную диагностику инфекционных заболеваний.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

1. Вакутайнер 5 мл для забора крови из вены.
2. Стерильный шприц для забора амниотической жидкости и пуповинной крови.
3. Набор для забора носоглоточных мазков (стерильный зонд-тампон в пробирке).
4. Стерильная емкость с крышкой для сбора мочи.

Оборудование и материалы для лабораторной диагностики

1. Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой.
2. Амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени.
3. Вортекс-шейкер.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф», 12 тыс. об./мин.
5. Холодильник на 2–8°C.
6. Морозильник на -20°C.
7. Автоматические пипетки с переменным объемом до 10; 20–200; 100–1000 мкл.
8. Стерильные одноразовые наконечники с фильтром объемом до 10; 20–200; 100–1000 мкл.
9. Стерильные пластиковые микропробирки объемом 1,5 и 0,2 мл.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- подозрение на краснуху, парвовирусную инфекцию, ветряную оспу, цитомегаловирусную инфекцию в период беременности;
- выявление у новорожденного клинических признаков инфекций, специфичных для перинатального периода.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Внутриутробные инфекции

Для верификации внутриутробного инфицирования вирусами краснухи, ветряной оспы, цитомегаловирусом, парвовирусом В19 проводится обследование женщины, плода, новорожденного в соответствии с предложенной схемой (рисунок).

Критериями включения являются:

- перенесенная в период беременности острая экзантемная инфекция;
- перенесенная в период беременности ОРВИ;
- артралгии или преходящие артропатии в период беременности;
- условия работы и быта (наличие тесного контакта с детьми);
- контакт беременной с заболевшими с сыпью даже при отсутствии у нее клинических признаков инфекции;
- возраст беременной и ее мужа (партнера);
- воспалительные заболевания матки, придатков;
- угроза прерывания беременности;
- многоводие.



Рисунок — Схема обследования пациентов высокого риска по реализации инфекций, специфичных для перинатального периода (краснуха, парвовирусная инфекция, цитомегаловирусная инфекция, ветряная оспа)

Клиническим материалом являются сыворотка крови, моча, мазок со слизистой оболочки носоглотки женщины и новорожденного, амниотическая жидкость, пуповинная кровь.

Сбор, подготовка, транспортировка и хранение клинических образцов

Сыворотка крови

Кровь в объеме 0,5–5 мл собирается в вакутайнер или стерильную центрифужную пробирку. После образования сгустка необходимо центрифугировать кровь в течение 15 мин при 3000 об./мин для отделения сыворотки. Затем сыворотку переносят в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке должны быть указаны имя или идентификационный номер пациента, дата забора и тип образца.

До исследования сыворотка может храниться и транспортироваться при 2–8°C в течение 7 дней с момента забора. Более длительное хранение проводится при -20°C.

Повторные циклы замораживания-оттаивания сыворотки крови не допускаются, т. к. это оказывает разрушающее действие на специфические антитела

и вирусные частицы и приводит к искажению результатов исследования.

Пуповинная кровь, амниотическая жидкость

Образцы пуповинной крови и амниотической жидкости получают при проведении диагностического кордо- и амниоцентеза, соответственно. Для отправки в лабораторию 0,5–1 мл биологической жидкости помещают в стерильную промаркированную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. На этикетке должны быть указаны имя или идентификационный номер пациента, дата забора и тип образца.

До исследования образцы могут храниться и транспортироваться при 2–8°C в течение 48 ч с момента забора. Более длительное хранение проводится при -70°C.

Повторные циклы замораживания-оттаивания пуповинной крови и амниотической жидкости не допускаются, т. к. это оказывает разрушающее действие на вирусные частицы и приводит к искажению результатов.

Мазки со слизистой оболочки носоглотки

Мазок со слизистой носоглотки (или образец слюны) может быть получен с использованием коммерческих наборов для сбора образцов для вирусологических исследований в соответствии с рекомендациями производителя набора. **Не используйте наборы для сбора образцов для бактериологических исследований!** При отсутствии коммерческих наборов необходимо использовать стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Тампон помещают между щекой и десной и удерживают до полного намочания, при этом аккуратными движениями потирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Затем тампон вносят в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды (или физиологического раствора), обламывают палочку и плотно закупоривают

пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре 2–8°C в течение 48 ч после сбора.

Если доставка образца в лабораторию будет произведена в течение 2 ч после сбора, допустимо поместить тампон с образцом в сухую стерильную пробирку с плотно закрывающейся пробкой. В лаборатории в пробирку необходимо добавить 2 мл вирусной транспортной среды и оставить на 1 ч при 2–4°C для элюирования вируса.

В лаборатории тампон извлекают из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Полученную суспензию хранят при 4°C не более 48 ч, длительное хранение осуществляется при -70°C. Повторное замораживание-оттаивание образца или длительное хранение при -20°C не допускается, т. к. это оказывает повреждающее действие на вирус.

Моча

Образцы мочи предпочтительно собирать утром, поскольку первая утренняя порция мочи содержит большее количество эпителиальных клеток. Мочу собирают в стерильный промаркированный флакон, плотно укупоривают и в день сбора образца отправляют с соблюдением холодовой цепи в лабораторию. Если доставка в тот же день не представляется возможной, образец хранят в течение 1 сут при температуре 4°C. Образец нельзя замораживать. В лаборатории образец центрифугируют при 2500 об./мин в течение 10 мин, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Повторное замораживание-оттаивание образцов или длительное хранение при -20°C не допускается, т. к. это оказывает повреждающее действие на вирус.

Лабораторная диагностика

Лабораторная диагностика вирусных инфекций с вертикальным механизмом передачи (краснуха, парвовирусная инфекция, ветряная оспа, цитомегаловирусная инфекция) проводится с использованием серологических и вирусологических методов (таблица). Для исследования применяются коммерческие наборы реагентов, зарегистрированные и разрешенные к применению в Республике Беларусь.

Таблица — Использование серологических и вирусологических методов в диагностике вирусных инфекций с вертикальным механизмом передачи

Показатель	Диагностическая значимость
Вирусспецифические IgM у женщины	Формируются в первые дни заболевания и сохраняются от 4–6 недель до нескольких месяцев
Вирусспецифические IgG у женщины	<ul style="list-style-type: none"> • Диагностическое значение имеет установление сероконверсии или значимого нарастания концентрации IgG в парных сыворотках крови • Используется для сопоставления с уровнем IgG у новорожденного • Позволяет сопоставить результаты ранее проведенного изучения иммунного статуса женщины и данные обследования при подозрении относительно заболевания • Отсутствие IgG антител позволяет исключить инфицирование
Авидность вирусспецифических IgG	Низкоавидные IgG соответствуют недавнему (<1,5 мес.) инфицированию, высокоавидные перенесенной в прошлом инфекции
Вирусспецифические IgG у новорожденного (плода)	Отражают наличие материнских антител, поступающих пассивно через плаценту, и собственных антител, сформированных при контакте с антигеном
Вирусспецифические IgM у новорожденного (плода)	Не проходят через плаценту, отражают выработку собственного иммунного ответа ребенка
Выделение и идентификация вируса, выявление генетического материала возбудителя (вирусной ДНК или РНК)	Проводится с использованием различных видов клинических образцов женщины и ребенка, свидетельствует о наличии инфицирования

Парвовирусная инфекция

Диагностика парвовирусной инфекции проводится в соответствии с инструкцией по применению алгоритма диагностики парвовирусной B19 инфекции № 124-1211 от 20.12.2011, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

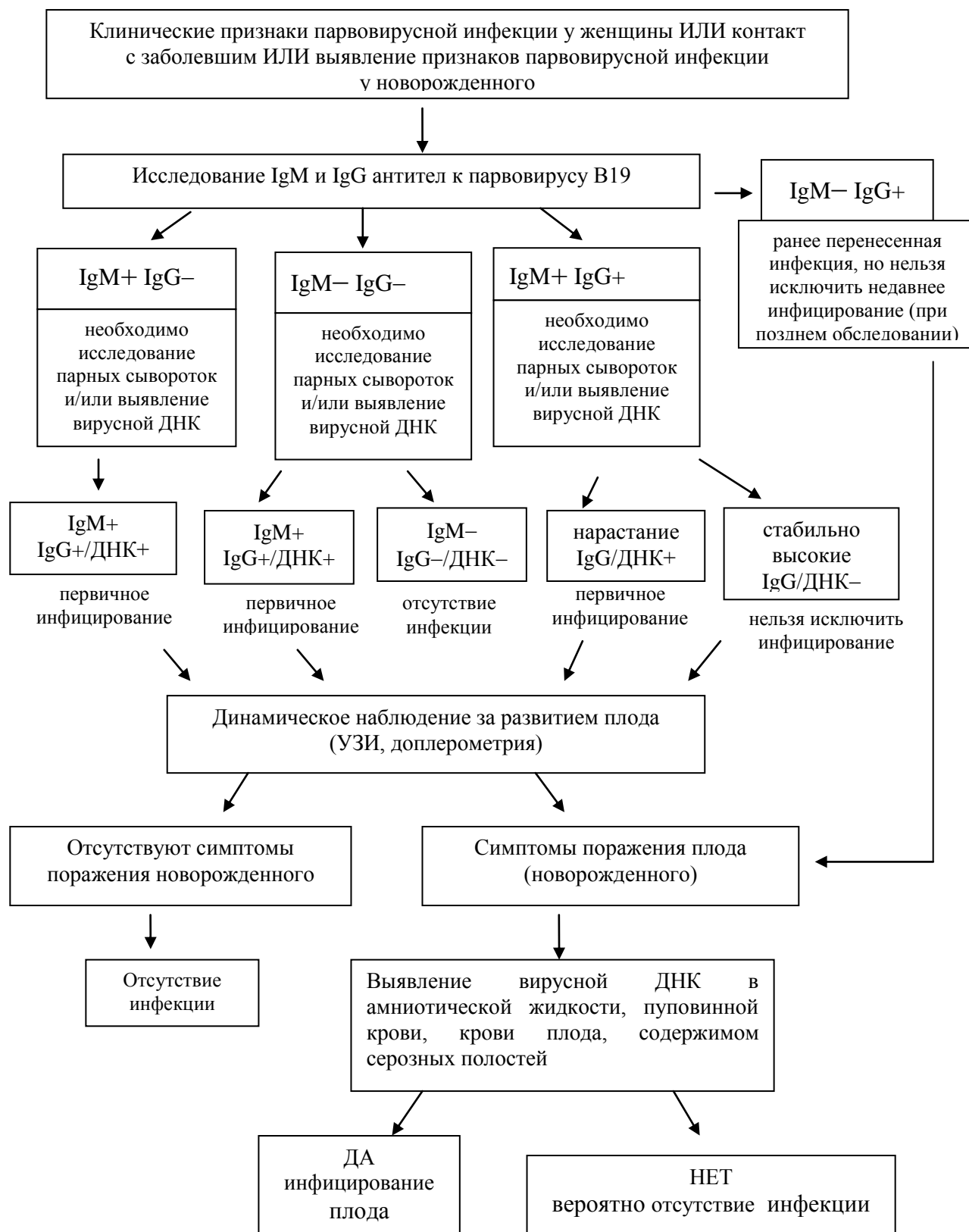
Обследование женщины осуществляется при наличии симптомов парвовирусной инфекции, контакте с заболевшим или выявлении признаков парвовирусной инфекции у новорожденного или плода (алгоритм 1). Отсутствие IgM и наличие IgG-антител свидетельствуют о ранее перенесенной инфекции, но не позволяют исключить заболевание в период беременности, если обследование проводится только после обнаружения симптомов

у новорожденного (плода). Выявление вирусной ДНК в сыворотке крови методом ПЦР является наиболее эффективным лабораторным критерием инфицирования.

У новорожденного наиболее надежным методом подтверждения антенатальной парвовирусной инфекции является выявление вирусной ДНК в биологических жидкостях и тканях (амниотической жидкости, крови, содержимом серозных полостей, плаценте). Специфические IgM-антитела к парвовирусу В19 обнаруживаются у новорожденных в редких случаях. Материнские IgG-антитела исчезают у ребенка в течение первых недель жизни. При тяжелом течении врожденной парвовирусной инфекции специфические IgG-антитела у новорожденного могут отсутствовать.

Диагноз врожденной парвовирусной инфекции ставится в случае выявления вирусной ДНК в биологических жидкостях и тканях, специфических IgM-антител, сохранения IgG-антител после шестимесячного возраста.

Алгоритм 1. — Диагностика парвовирусной инфекции у беременной и новорожденного



Краснуха

Серологические методы составляют основу диагностики краснухи в период беременности (алгоритм 2).

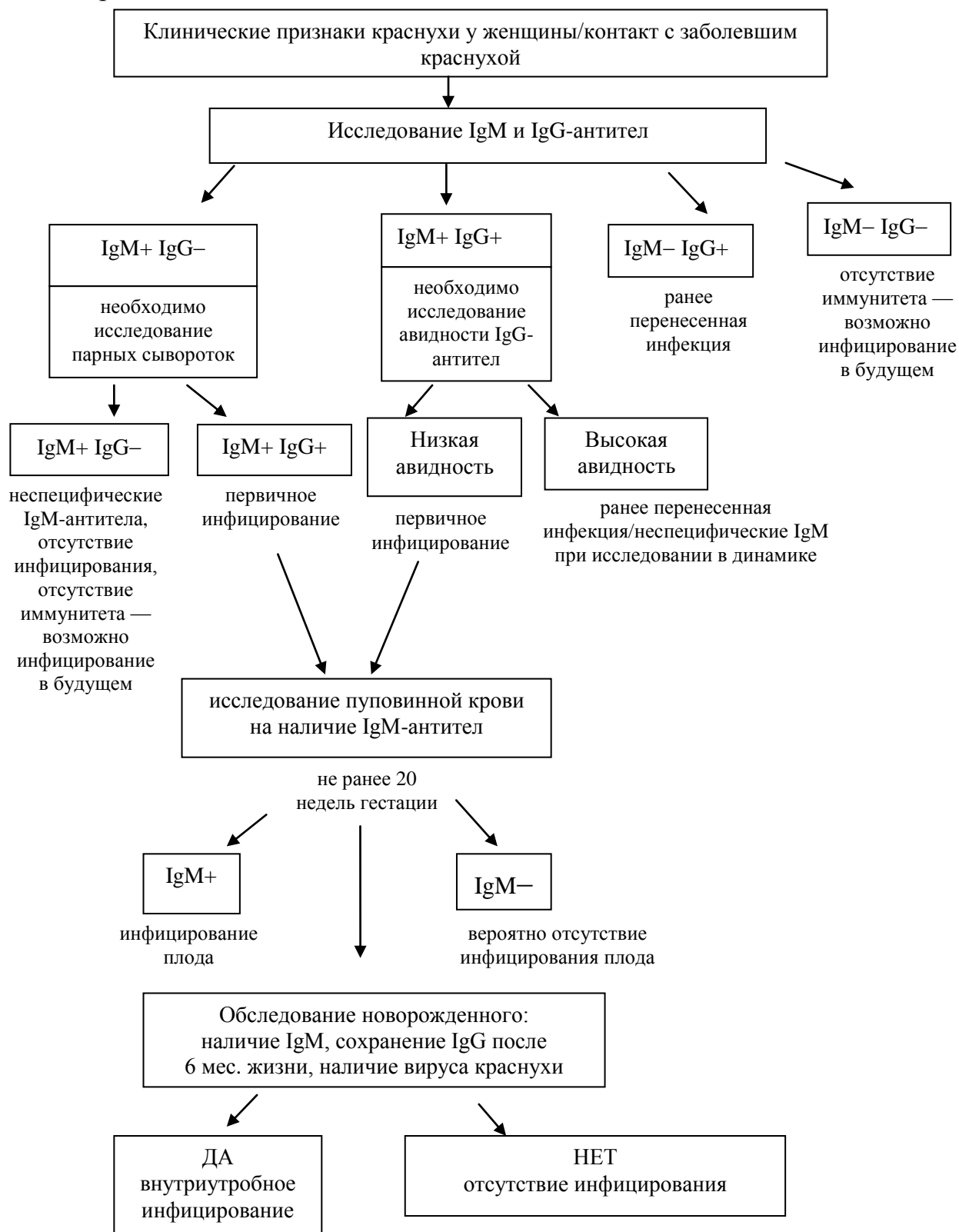
При постнатальном заболевании краснухой IgM-антитела выявляются через 3–4 дня после возникновения сыпи и сохраняются в течение 4–8 недель. IgG-антитела сохраняются пожизненно.

Ложноположительные IgM-антитела к вирусу краснухи определяются у 1% здоровых беременных. Вирусологические методы являются малоэффективными для верификации постнатальной краснухи.

У плода IgM-антитела к вирусу краснухи могут определяться в сыворотке крови после 20–22 недель гестации. У новорожденного выявление IgM-антител к вирусу краснухи является надежным критерием диагностики внутриутробного инфицирования. Обнаружение IgG-антител после 6-месячного возраста (после исчезновения материнских антител) также позволяет подтвердить наличие инфекции. Вирусная РНК может быть установлена методом ПЦР в течение первых нескольких недель жизни. Материалом для вирусологического исследования являются моча, соскоб со слизистой оболочки носоглотки, отделяемое конъюнктивы, фекалии новорожденного.

Диагноз врожденной краснухи ставится в случае обнаружения специфических IgM-антител, вирусной РНК в биологических жидкостях и тканях, сохранения IgG-антител после 6-месячного возраста.

Алгоритм 2. — Диагностика краснухи у беременной женщины и новорожденного



Цитомегаловирусная инфекция

Наибольшая опасность внутриутробного поражения плода существует при первичном инфицировании. Специфические IgM-антитела быстро формируются после первичного инфицирования женщины и сохраняются до нескольких месяцев (алгоритм 3). Реинфицирование сопровождается

выработкой IgM-антител в редких случаях. IgG-антитела к цитомегаловирусу сохраняются пожизненно.

Алгоритм 3. — Диагностика цитомегаловирусной инфекции у беременной и новорожденного



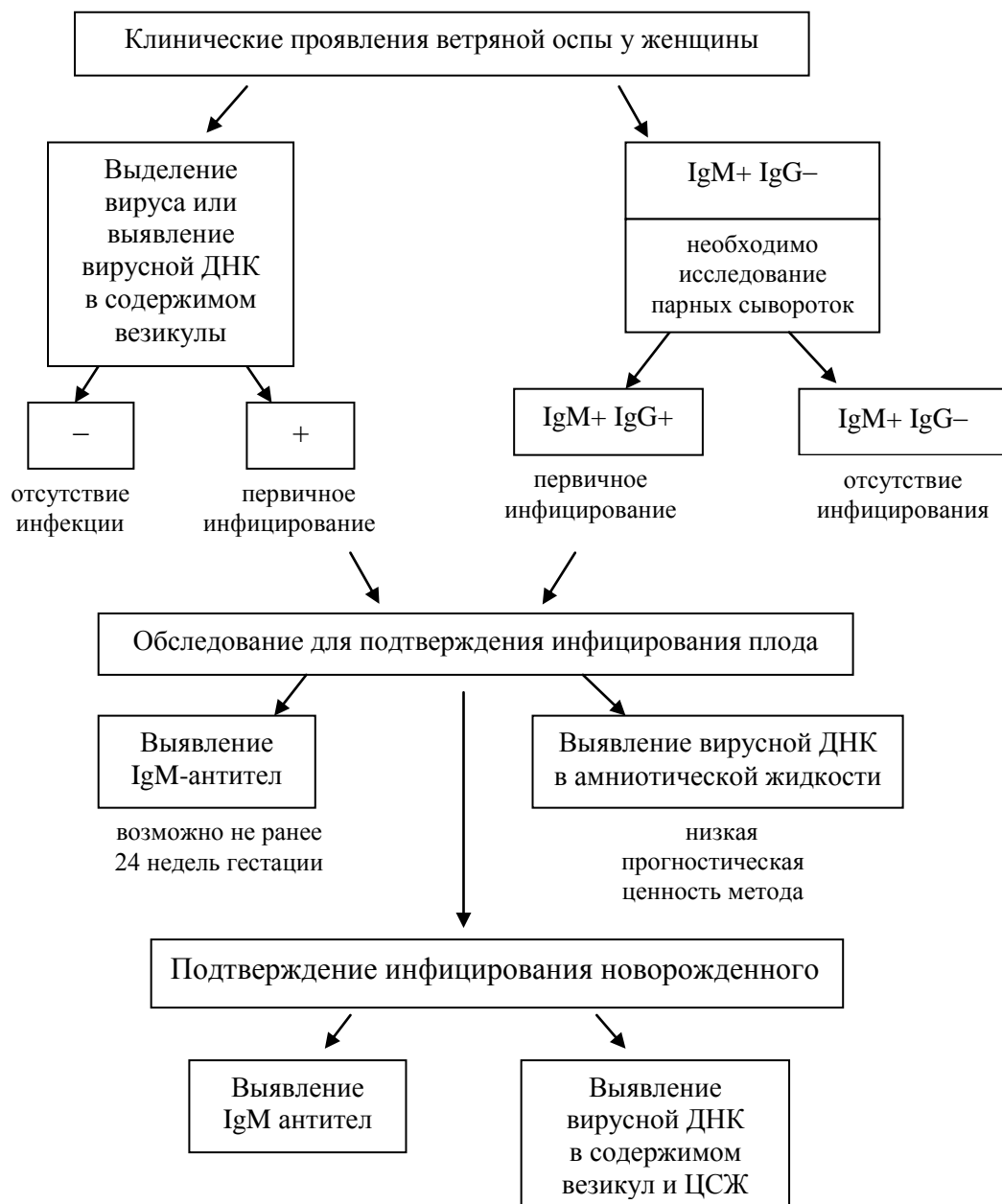
Проводить обследование плода с целью пренатальной диагностики цитомегаловирусной инфекции следует не ранее 21 недели гестации и не ранее чем через 6–9 недель после инфицирования женщины (если срок инфицирования возможно установить). Высокочувствительным методом пренатальной диагностики является выявление ДНК цитомегаловируса в амниотической жидкости методом ПЦР. Исследование IgM-антител к цитомегаловирусу неэффективно для диагностики внутриутробной цитомегалии.

У новорожденного для подтверждения инфицирования выявляют вирусную ДНК. Материалом для исследования служат моча, слюна, кровь, спинномозговая жидкость. Для расчета вирусной нагрузки и оценки эффективности противовирусной терапии используется метод ПЦР в режиме реального времени. Диагноз врожденной цитомегаловирусной инфекции ставится в случае обнаружения вирусной ДНК в биологических жидкостях и тканях.

Ветряная оспа

При заболевании ветряной оспой специфические IgM-антитела персистируют в крови в течение 4–5 недель, IgG-антитела сохраняются пожизненно. Диагноз ветряной оспы основан на выявлении вируса в содержимом везикулы и наличии сероконверсии IgG-антител (алгоритм 4).

Алгоритм 4. — Диагностика ветряной оспы у беременной и новорожденного



IgM-антитела у плода могут быть обнаружены после 24 недель гестации. Подтвердить инфицирование плода можно также на основании выявления вирусной ДНК в амниотической жидкости методом ПЦР, однако это исследование нередко дает ложноотрицательные результаты. Кроме того, положительный результат не обязательно свидетельствует о поражении плода,

в связи с чем метод имеет невысокую прогностическую ценность. У новорожденного диагноз врожденной ветряной оспы ставится на основании выявления специфических IgM-антител в сыворотке крови и вируса в содержимом везикул или цереброспинальной жидкости (при поражении ЦНС).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При условии правильного использования предложенных алгоритмов ошибки и осложнения исключены.