Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра молекулярной биологии и генетики

Дисциплина: Теоретические и практические основы молекулярной диагностики инфекционных заболеваний

Внеаудиторная самостоятельная работа

Молекулярные методы в диагностике инфекций беременных и новорожденных (TORCH-инфекции)

Работу выполнил(а): студент(ка) курс, группf,   
медико-биологического факультета   
ФИО   
Работу проверил(а):   
Чирсков Павел Романович

г. Волгоград 2021

|  |  |
| --- | --- |
| **Оглавление** | **стр** |
| Введение | 3 |
| Методы диагностики внутриутробной инфекции во время беременности | 6 |
| Методы диагностики инфекции у плода | 9 |
| Метод ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний | 10 |
| Современные подходы к диагностике внутриутробных инфекций | 13 |
| Заключение | 15 |
| Литература | 16 |

Введение

Инфекционная патология является одной из наиболее актуальных проблем перинатологии, определяющей высокий уровень заболеваемости и смертности новорожденных детей. Внутриутробное инфицирование плода и новорожденного играет существенную роль в развитии инфекционно-воспалительных заболеваний. Под внутриутробной инфекцией (ВУИ), или инфекционным процессом, принято понимать взаимодействие микроорганизма с макроорганизмом в условиях влияния внешней среды. Однако не каждая встреча микроорганизма с макроорганизмом заканчивается развитием инфекционного заболевания. Об инфекционном заболевании говорят лишь в том случае, если в результате воздействия микроорганизма на макроорганизм нарушаются функции последнего на фоне формирования морфологического субстрата болезни и появления клинических симптомов, выявляемых пренатально или вскоре после рождения. Детский организм нельзя рассматривать как организм взрослого в миниатюре. Реакция новорожденного на воздействие инфекционного агента принципиально отличается от таковой у детей старшего возраста и у взрослых. Это различие определяется физиологической незрелостью всех компонентов, обеспечивающих как неспецифическую защиту организма, так и его специфическую реактивность при встрече с инфекционным агентом. Внутриутробная инфекция занимает одно из ведущих мест в структуре неонатальной смертности, являясь основной причиной смерти или осложняя течение основного заболевания у 37,5% умерших новорожденных. Достоверных данных об истинной распространенности ВУИ нет. Однако, согласно данным ряда исследований, инфекционные заболевания выявляют у 50-60% госпитализированных доношенных и 70% недоношенных новорожденных. В 37% причиной смерти новорожденных детей является инфекционная патология. Диагностика внутриутробных инфекций составляет не более 3-5%. Основной причиной ВУИ являются инфекционные урогенитальные заболевания матери, частота которых в структуре заболеваемости беременных сохраняется высокой в течение последних 10 лет и составляет 88-100 на 1000 беременных. К сожалению, в настоящее время мы не имеем достоверных сведений о вероятности заражения плода от инфицированной матери, но риск инфицирования плода различными микроорганизмами, выделенными у матери, колеблется от 5 до 70%, а данные о частоте реализации инфекции у новорожденного недостаточны и крайне противоречивы. Ранняя диагностика инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных остается актуальной до настоящего времени, в связи с чем в последние годы применяются новые информативные диагностические методики. К ним относятся исследование цитокинового статуса, определение белков острой фазы (С-реактивный белок) и прокальцитонина (ПКТ), а также другие диагностические тесты, характеризующиеся выявлением того или иного достоверно отличающегося параметра. Первичная микробная колонизация новорожденного происходит в процессе родов. В нормальных условиях плод может колонизироваться коагулазоотрицательными стафилококками, которые чаще всего заселяют родовые пути матери, околоплодные воды и плаценту. Преобладание в посевах грамотрицательной флоры, золотистого стафилококка, стрептококка группы В, их ассоциации свидетельствует о патологической колонизации, которая обычно наблюдается у новорожденных из группы риска по внутриутробному инфицированию. Изменение условий жизни, влияние неблагоприятных факторов внешней среды, промискуитет, отказ от вакцинации, увеличение числа женщин с экстрагенитальной патологией приводят к нарушению гармоничного развития беременности и в связи с этим к реализации внутриутробного инфицирования. В настоящее время появились новые подходы к лечению перинатальных инфекций, меняются методы диагностики внутриутробного инфицирования и тактика оказания помощи беременной и новорожденному, что в большинстве случаем помогает своевременно начать лечение и улучшить исходы беременности и родов.

Перинатальные инфекции (ПИ) — это заболевание плода или новорожденного, которые возникают в результате гематогенной (транслацентарной), амниальной, восходящей или нисходящей инфекции, которая состоялась в позднем фетальном периоде (после 22-й недели гестации) с клиническими проявлениями заболевания в течение раннего неонатального периода. Внутриутробные инфекции (ВУИ) - группа инфекционно-воспалительных заболеваний плода и новорождённого, вызванных различными возбудителями, при которых инфицирование плода произошло в анте- или интранатальный период. Термин «внутриутробная инфекция» при использовании в клинической практике в качестве диагноза должен быть конкретизирован не только по этиологии, но и по периоду инфицирования, особенностям поражения тех или иных внутренних органов. Для обозначения ВУИ также может быть использован термин «TORCH-синдром», этим термином описывают врожденные инфекционные заболевания, этиология которых остается нерасшифрованной. Данный термин образован первыми буквами латинских названий, наиболее часто верифицируемых ВУИ: Т - токсоплазмоз (Toxoplasmosis), R -краснуха (Rubella), С - цитомегаловирус (Cytomegalia), H - герпес (Herpes) и О - другие инфекции(Other). К последним относят сифилис, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекцию, хламидийную и микоплазменную инфекцию и др. Термины «внутриутробное инфицирование» и «внутриутробная инфекция» не являются синонимами. Внутриутробное инфицирование отображает факт инвазии микроорганизма в организм плода, что не всегда приводит к развитию патологических изменений. Внутриутробное инфицирование происходит значительно чаще, чем развиваются клинические проявления болезни, и потому этот термин не должен употребляться как диагноз.

Методы диагностики внутриутробной инфекции во время беременности

Диагностика ВУИ крайне затруднительна. Прежде всего, опираются на данные анамнеза, особенности течения беременности. Методы лабораторной диагностики ВУИ можно разделить на прямые и непрямые. К прямым относится: микроскопия, культуральный метод, репликация вируса на тканях, выявление антигенов РИФ или ИФА, ПЦР. Непрямые методы диагностики — это серологические исследования методом иммуноферментного анализа (ИФА) качественный и количественный анализ IgM, IgG, IgA. У новорожденного исследуют кровь. Наличие IgG может говорить о трансплацентарном заносе антител материнских, поэтому кровь новорожденного исследуют повторно через 3-4 недели. Диагностически значимым является увеличение титра IgG в 4 раза и более. Обнаружение в крови новорожденного IgM говорит о наличии активной инфекции у ребенка. Из дополнительных исследований - в общем анализе крови можно обнаружить лейкоцитоз со сдвигом влево, лейкоцитоз с нейтропенией, токсическую зернистость нейтрофилов, анемию. Кроме того, детям с подозрением на ВУИ необходимо провести УЗИ брюшной полости для выявления гепатоспленомегалии, нейросонографию. Достоверность этиологической диагностики TORCH-инфекций только поклиническим данным не превышает 10%. При наличии клинико-анамнестических данных, указывающих на вероятность ВУИ у новорождённого, верификацию заболевания необходимо проводить с использованием «прямых» и «непрямых» методов исследования. К «прямым» методам диагностики относят вирусологический, бактериологический и молекулярно-биологический методы (ПЦР, ДНК-гибридизация) и иммунофлюоресценцию. Из «непрямых» методов диагностики наиболее широко используют ИФА. В последнее время для выявления возбудителя в биологическом материале всё чаще применяют метод ПЦР. Материалом для исследования может служить любая биологическая среда организма (пуповинная кровь, слюна, моча, смывы трахеи, ротоглотки, мазки конъюнктивы, из уретры и т.д.). Подтверждением активного периода ВУИ служит выявление специфических IgM и низкоавидных специфических антител IgG с нарастанием их титров в динамике. При этом обязательно сопоставление полученных данных с результатами параллельного серологического обследования матери. Следует помнить, что выявление специфических IgM или повышение титра низкоавидных антител в пуповинной крови свидетельствует о внутриутробном контакте плода с соответствующим микроорганизмом, но не доказывает того, что данный микроорганизм – причина инфекционного заболевания. Для уточнения фазы и остроты инфекционного процесса показано проведение серологического исследования методом ИФА с количественным определением специфических антител классов IgM, IgG и оценкой уровня их авидности. Авидность - понятие, характеризующее скорость и прочность связывания антигена с антителом, косвенный признак функциональной активности антител. В остром периоде развития инфекции сначала происходит образование специфических антител к IgM, а затем – специфических низкоавидных антител к IgG. Таким образом, эти антитела можно считать маркёром активного периода заболевания. По мере стихания остроты процесса авидность антител к IgG нарастает, возникают высокоавидные иммуноглобулины, которые практически полностью заменяют синтез IgM. Таким образом, роль серологических маркёров острой фазы инфекционного процесса играют IgM и низкоавидные IgG. Если титры специфических антител к IgG у ребёнка прирождении равны материнским, а при повторном обследовании отмечают их снижение, то высока вероятность, что они имеют материнское происхождение.

Методы диагностики перинатальных инфекций.

1. Исследование содержимого цервикального канала, влагалища, уретры: бактериоскопическое, бактериологическое (качественное и количественное), вирусологическое

2. Исследование крови на наличие специфических антител - серологические исследования.

1.Наличие в крови специфических IgM - антител при отсутствии IgG - антител свидетельствует о ранней острой фазе заболевания.

2. наличие специфических антител обоих классов свидетельствует об острой инфекции в более поздней фазе, или о реактивации латентной инфекции. При определении IgM -, IgG -антител во время беременности часто по различным причинам наблюдаются ложно позитивные реакции. Поэтому в таких случаях лишь динамика и авидность титров IgG - антител в сыворотке крови, взятых с интервалом 5 дней (парные сыворотки), с нарастанием титров в 4 и более раз, будет подтверждать наличие инфекции. В таких случаях решение зависит от вида возбудителя, срока беременности и других обстоятельств, которые характеризуют ситуацию:

3. наличие у беременной лишь IgG - антител говорит о состоянии иммунитета;

4. отсутствие антител обоих классов свидетельствует о том, что инфекции в прошлом не было, а есть потенциальная возможность первичного инфицирования во время беременности и возникновения внутриутробной инфекции плода. Таким беременным показаны повторные серологические обследования с целью раннего выявления первичной инфекции, особенно угрожающей для плода

3. Исследование мочи: бактериологическое (качественное и количественное), вирусологическое, микроскопическое, биохимическое (определение нитритов) Исследование мочи имеет целью выявление бессимптомной бактериурии или подтверждение диагноза манифестных форм инфекции мочевых путей (уретрит, цистит, пиелонефрит). Бессимптомная бактериурия - наличие в 1 мл средней порции мочи микробных возбудителей в количестве колоний образовывающих единиц (КОЕ) при отсутствии любых клинических проявлений. Возможна также лейкоцитурия (не обязательно).

4. Молекулярно-биологические методы: лигазная цепная реакция, полимеразная цепная реакция

Методы диагностики инфекции у плода

1. Ультрасонография - позволяет выявить синдром задержки роста плода, аномальное количество околоплодных вод, изменения структуры плаценты, водянку плода, гидроцефалию, церебральные кальцификаты, расширение чашечно-лоханочной системы почек, гепатомегалию, гиперэхогенностью кишечника.

2. Трансабдоминальный амниоцентез (по показаниям) со следующей идентификацией возбудителя в околоплодных водах.

3. Кордоцентез (по показаниям) - определение возбудителя и/или уровня специфических антител в пуповинной крови.

Методы лечения перинатальных инфекций.

Комплексное обследование женщин с целью выявления инфицированности возбудителями пренатальных инфекций, особенно группы TORCH, следует проводить к беременности. Лечение этих инфекций является одной из основных задач прегравидарной подготовки. Однако большая часть этих инфекций эффективна или вообще не лечится. Все женщины репродуктивного возраста, которые планируют беременность, должны быть тестируемые на наличие антител к вирусу краснухи (А). Серонегативным женщинам рекомендуют вакцинацию со следующей контрацепцией на протяжении трех месяцев. Целесообразно также к наступлению беременности проводить прививку против гепатита В Дифференциальный диагноз ВУИ проводят между собой, с неинфекционными эмбрио- и фетопатиями, гипоксически-ишемической энцефалопатией, наследственной патологией, желтухами различного происхождения, синдромом дыхательных расстройств, внутричерепными родовыми травмами, постнатальными инфекциями, сепсисом.

Метод ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний

Для правильного и своевременного лечения заболеваний, вызываемых различными инфекционными агентами, необходимо установление точного диагноза. Для решения этой проблемы в последние годы применяются современные методы молекулярной биологии. В настоящее время метод амплификации нуклеиновых кислот полимеразной цепной реакцией (ПЦР) достаточно широко используется в практической медицине.

Выделение геномов инфекционных агентов с использованием ПЦР является одним из наиболее достоверных методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Известно, что при проведении серологической диагностики возможно получение ложноположительных результатов за счет существования антигенных перекрестов между белками различных вирусов и

между вирусными и клеточными белками. Кроме этого у новорожденных продукция антител к определенным антигенам может отсутствовать. Специфичность диагностики методом иммунофлюоресцентного анализа (ИФА) при исследовании клинических образцов у новорожденных детей часто снижается из-за присутствия различных контаминантов, а его чувствительность может оказаться недостаточной для обнаружения антигенов с низким уровнем продукции.

Метод ПЦР включает три стадии. На первой стадии при температуре 94°С (или выше) происходит денатурация двойной цепи, исследуемой ДНК (стадия денатурации). На второй стадии два олигонуклеотида-праймера, строго специфичные (гомологичные)к определенным участкам антипараллельных цепей исследуемой ДНК, связываются (образуют гибриды с помощью водородных связей) с этими участками ДНК (стадия отжига). На третьей стадии при температуре 70–72°С с участием термофильной ДНК-полимеразы и дезоксинуклеозид-5ў-трифосфатов происходит синтез новых цепей ДНК. Инициация синтеза ДНК происходит в местах связывания олигонуклеотидов-праймеров с исследуемой ДНК, матрицей для синтеза служат исходные цепи ДНК (стадия полимеризации). Таким образом, за цикл (три стадии) происходит удвоение каждой из двух антипараллельных цепей ДНК. Теоретически, при проведении 20 таких циклов происходит увеличение количества исходной ДНК примерно в миллион раз.

Основным достоинством метода является чрезвычайно высокая чувствительность анализа – до 1 копии геномной ДНК возбудителя инфекции в исследуемой пробе в «nested»–варианте ПЦР (с «внутренней» и «внешней» парами олигонуклеотидовпраймеров). Чувствительность выявления ДНК в ПЦР с одной парой праймеров составляет обычно 30–100 копий генома в исследуемой пробе.

Возможности, заложенные в методе ПЦР, позволяют достигать максимальной специфичности анализа, то есть отсутствия перекрестных реакций со сходными микроорганизмами, способности выявлять ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК организма-хозяина, а также проводить генотипирование. Соответствующий выбор олигонуклеотидов-праймеров, определяющих, в основном, специфичность анализа, позволяет ставить методики одновременного выявления ДНК близкородственных микроорганизмов. Достоинством метода является то, что вследствие химического сродства нуклеиновых кислот различных возбудителей, для диагностики практически всех инфекционных заболеваний могут быть использованы один набор оборудования и незначительно отличающиеся (в основном структурой олигонуклеотидов-праймеров) наборы реактивов. Подготовка пробы и постановка анализа являются универсальной процедурой. К настоящему времени метод автоматизирован и позволяет получать результаты анализа в течение одного рабочего дня.

Область применения метода ПЦР в клинической диагностике:

– ранняя диагностика инфекционных заболеваний у серонегативных пациентов, когда лечение наиболее эффективно;

– выявление персистирующих, латентных и рецидивирующих

форм инфекций;

– контроль проведения лечения;

– диагностика оппортунистических инфекций, часто протекающих на фоне иммунодефицита, вследствие чего постановка

диагноза только по результатам серологических исследований

затруднена, из-за имеющихся несоответствий между параметрами иммунного ответа и течением заболевания;

– уточнение сомнительных результатов серологических исследований;

– эпидемиологические исследования;

– выявление наиболее патогенных штаммов инфекционных агентов;

– исследования инфекционности пулированных образцов крови

и ее продуктов, применяемых в клинике;

– определение резистентности к лекарственным препаратам.

Методы ДНК-диагностики незаменимы в пренатальной диагностике наследственных заболеваний (муковисцидоза, фенилкетонурии, гемофилии и пр.), а также при установлении отцовства.

Следует отметить, что широкое использование ДНК-диагностики ни в коей мере не отменяет методы иммунохимических исследований (ИФА, РИФ и др.), а дополняет их. Комплексное обследование пациента различными методами дает возможность врачу получить более полную информацию как о наличии инфекционного агента, так и об иммунном статусе пациента. Это позволяет более точно ставить диагноз и назначать соответствующее этиотропное лечение с последующим его контролем.

Современные подходы к диагностике внутриутробных инфекций

Одним из современных направлений поиска предикторов и способов терапевтического контроля при ВУИ является изучение особенностей антиоксидантной защиты в системе мать—плацента—плод. В образцах плазмы крови беременных с ВУИ были обнаружены достоверное увеличение ферментативной активности каталазы (р<0,009) и изменение уровня содержания фермента супероксиддисмутазы в ткани вартонова студня пуповины для изоформы митохондриального происхождения (SOD2). К скрининговым тестам у новорожденных группы высокого риска развития ВУИ можно отнести микроскопическое исследование мазков околоплодных вод, плаценты, бактериологические исследования пуповинной крови и содержимого желудка новорожденного. В отдельных случаях рекомендуется исследование культуры крови новорожденного, причем наиболее целесообразно капиллярной, а не пуповинной крови. Определенную диагностическую ценность имеют клинический и биохимический анализы крови. Обращают внимание на число тромбоцитов (признаком инфицирования считают тромбоцитопению ниже 150·109/л), соотношение юных форм лейкоцитов и нейтрофилов, определение активности щелочной фосфатазы. Проблеме своевременной диагностики ВУИ посвящено много научных работ, разработано большое количество разнообразных инструментальных и лабораторных тестов. О.Н. Новиковой и соавт. изучены возможности прогнозирования перинатальных осложнений при внутриутробном инфицировании с использованием анализа вариабельности ритма сердца матери и плода, взаимоотношений между ними. Выявленные особенности вегетативной регуляции кардиоритма матери и плода в зависимости от стадий инфицирования последа позволили оценить его роль в механизмах защиты от инфекции. Авторами показано, что при снижении компенсаторных морфологических реакций плаценты под влиянием инфекции взаимосвязь между матерью и плодом нарушается, что клинически проявляется осложнениями для плода. В последние годы показана роль однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов иммунного ответа в формировании генетически обусловленных различий в инфекционной резистентности и клиническом течении инфекционных заболеваний, что обосновывает поиск генетически обусловленных особенностей иммунной системы матери, влияющих на риск реализации ВУИ у плода и новорожденного. Авторами показана возможность использования клинико-анамнестических и молекулярно-генетических данных в качестве предикторов ВУИ и выделения группы беременных высокого риска ее реализации. При положительном результате тестов с целью профилактики внутриутробного инфицирования плода беременной обычно проводят курс лечения с назначением антибактериальных и противовирусных препаратов, порой основываясь на результатах одного, не самого достоверного, анализа. Не всегда обоснованно выбираются препараты, схемы терапии и пути введения, очень часто в схемах лечения содержатся препараты неспецифической терапии (иммуномодуляторы, биостимуляторы и т.д.), эффективность и безопасность использования которых при беременности мало доказана. Таким образом, комплексное исследование видового состава микроорганизмов родовых путей, околоплодных вод, плаценты, новорожденного, определение антигенов и антител к предполагаемому возбудителю в пуповинной крови и АЖ, гистологическое исследование последа позволяют определить путь инфицирования ребенка, природу возбудителя и уточнить объем необходимых дополнительных диагностических процедур и лечебно-профилактических мероприятий в раннем неонатальном периоде.

Заключение

Инфекционные заболевания, возникающие во время беременности, обусловливают внутриутробное инфицирование плода, приводящее к ранней детской смертности и возникновению пороков развития. Чаще всего женщины болеют бессимптомно (без выраженных клинических проявлений). Необходимо проведение целенаправленной пренатальной диагностики для выявления латентных инфекционных процессов у беременных женщин.

При изучении анамнеза следует обращать внимание на лихорадочные состояния, наличие хронических воспалительных заболеваний. Характерной особенностью течения инфекционного процесса является угроза самопроизвольного прерывания беременности, обусловленная воспалительными изменениями в плаценте и матке. Как признак внутриутробной инфекции и повышения вероятности инфицирования плода можно рассматривать патологию плаценты: предлежание, приращение, отслойку, разрыв сосудов пуповины.

Наиболее часто течение беременности при развитии внутриутробной инфекции сопровождается угрозой самопроизвольного выкидыша, хронической фетоплацентарной недостаточностью, хронической внутриматочной инфекцией, развитием хронической внутриутробной гипоксии плода. Сочетанная патология при внутриутробных инфекциях частооказывается несовместимой с жизнью, несмотря на все использованные возможности интенсивной терапии и реанимации. Следует отметить, что в связи с высоким риском развития отсроченных осложнений, свойственных ряду внутриутробных инфекций, лечение новорожденный детей должно проводиться даже при выделении латентных возбудителей.

Литература

1. Долгушина Н.В., Макацария А.Д. Эндотелиальные повреждения и плацентарная недостаточность у беременных с вирусными инфекциями. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2008;2:13-17.

2. Володин, Н.Н. Неонатология: Национальное руководство. Краткое издание / Под ред.Н.Н. Володина. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 896 с.

3. Никитина Л.А., Демидова Е.М., Радзинский В.Е., Демидов Б.С., Самоходская Л.М. Роль матриксных белков, цитокинов и факторов ангиогенеза маточно-плацентарного комплекса в регуляции имплантации и плацентации. Акушерство и гинекология. 2007;3:5-10.

4. Никитин В.Г., Владимирова Н.Ю., Чижова Г.В. Прегравидарная подготовка и планирование беременности у женщин с бессимптомной цитомегаловирусной инфекцией. Медицинская помощь. 2008;6:16-18.

5. Шабалов Н.П. Основы перинатологии: учебник /Н.П. Шабалов, Ю.В. Цвелев. – 2-е изд., перераб. и доп. –Москва: МЕДпресс-информ, 2002. – 576 с.: