

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

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:

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

Инструкция по применению 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.

Показания и противопоказания к применению

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:

Противопоказаний не имеет.

Перечень необходимого оборудования, реактивов, изделий медицинской техники

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов

Вакутайнер 5 мл для забора крови из вены.

Стерильный шприц для забора амниотической жидкости и пуповинной крови.

Набор для забора носоглоточных мазков (стерильный зонд-тампон в пробирке).

Стерильная емкость с крышкой для сбора мочи.

Оборудование и материалы для лабораторной диагностики

Ламинарное укрытие с бактерицидной лампой.

Амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени.

Вортекс-шейкер.

Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф», 12 тыс. об/мин.

Холодильник на 2-8°C.

Морозильник на -20°C.

Автоматические пипетки с переменным объемом до 10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл.

Стерильные одноразовые наконечники с фильтром объемом до 10 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл.

Стерильные пластиковые микропробирки объемом 1,5 мл и 0,2 мл.

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 женщины с заболевшими с сыпью даже при отсутствии у нее клинических признаков инфекции,
- возраст беременной и её мужа (партнёра),
- 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

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

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

Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания сыворотки крови, 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 кордоцентеза 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 проведения исследования образцы могут храниться и транспортироваться при +2-8°C в течение 48 часов с момента забора. Более длительное хранение проводится при -70°C.

Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания пуповинной крови и амниотической жидкости, т.к. это оказывает разрушающее действие на вирусные частицы и приводит к искажению результатов исследования.

Мазки со слизистой 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 используйте стерильный ватный тампон, закрепленный на деревянной или пластмассовой палочке.

Поместите тампон между щекой и десной и удерживайте до полного намокания, при этом аккуратными движениями потирая слизистую оболочку, чтобы захватить эпителиальные клетки. Внесите тампон в подписанную пробирку, содержащую 2 мл вирусной транспортной среды (или физиологического раствора), обломайте палочку и плотно укупорьте пробирку. Образец должен быть доставлен в лабораторию при температуре +2-8°C в течение 48 часов после сбора.

Если доставка образца в лабораторию будет произведена в течение 2 часов 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 час при +2-4°C для элюирования вируса.

В лаборатории извлеките тампон из пробирки с транспортной средой, тщательно отжимая о стенки сосуда. Полученную суспензию хранят при $+4^{\circ}\text{C}$ не более 48 часов, длительное хранение осуществляется при -70°C . Не допускайте повторного замораживания-оттаивания образца или длительного хранения при -20°C , так как 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 закупоривают и в день сбора образца отправляют с соблюдением холодной цепи в лабораторию. Если доставка в тот же день не представляется возможной, образец хранят в течение суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Образец нельзя замораживать. В лаборатории образец центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут, удаляют надосадок, а осадок ресуспендируют в 1 мл вирусной транспортной среды.

Не допускайте повторного замораживания-оттаивания образцов или длительного хранения при -20°C , так как 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
1	2
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 на заболевание. • Отсутствие IgG антител позволяет исключить инфицирование.
Авидность вирусспецифических IgG	Низкоавидные IgG соответствуют недавнему (<1,5 месяца) 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

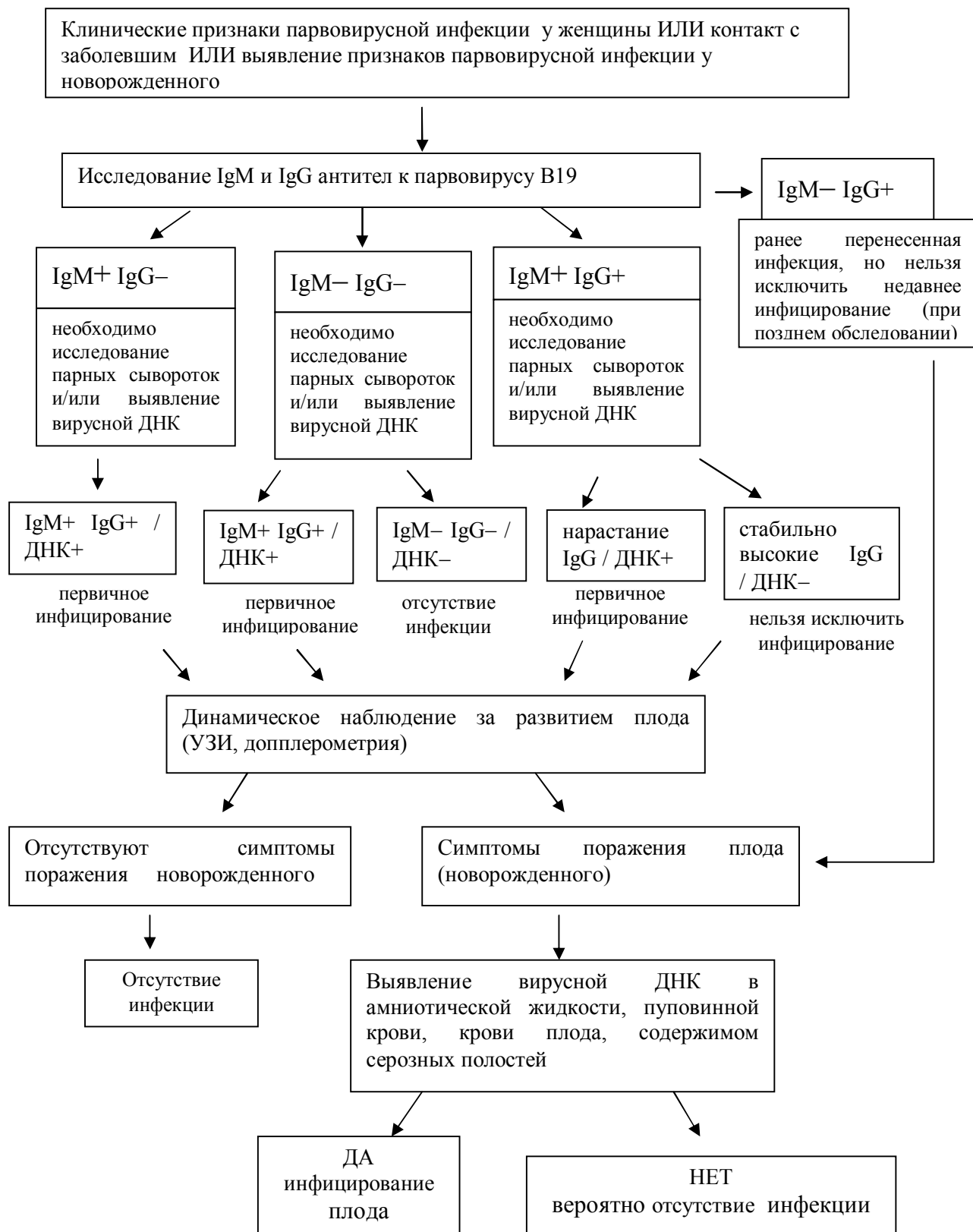
Диагностика парвовирусной инфекции проводится в соответствии с Инструкцией по применению алгоритма диагностики парвовирусной В19 инфекции №124-1211 от 20.12.2011, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Обследование **женщины** проводится 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 свидетельствует о ранее перенесенной инфекции, но не позволяет исключить заболевание в период беременности, если ее 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, обнаружения специфических IgM антител, сохранения IgG антител после шестимесячного возраста.

Алгоритм 1 – Диагностика парвовирусной инфекции у беременной женщины и новорожденного



Краснуха

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

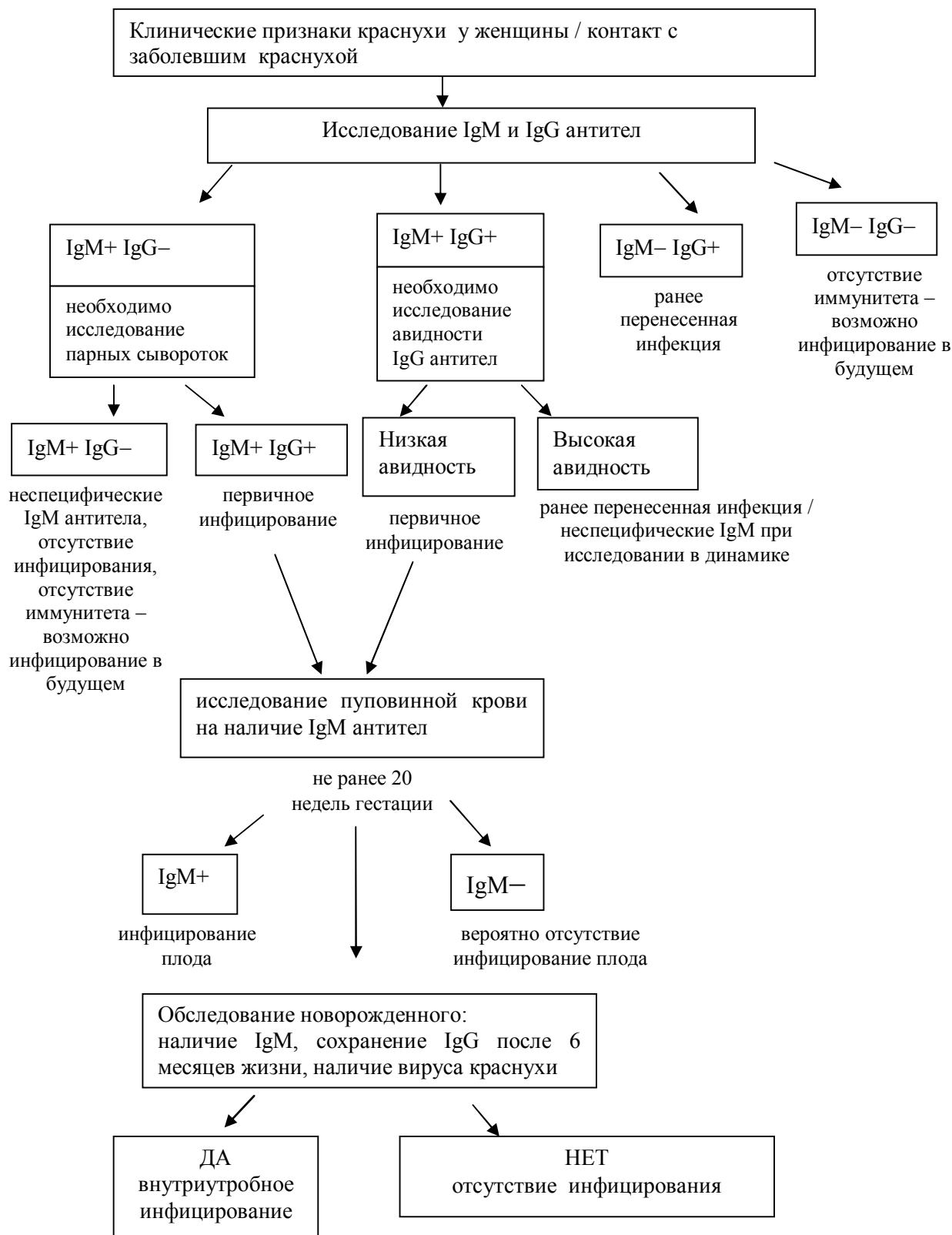
При постнатальном заболевании краснухой IgM антитела выявляются через 3-4 дня после возникновения сыпи и сохраняются в течение 4-8 недель. IgG антитела сохраняются пожизненно.

Ложно положительные IgM антитела к вирусу краснухи выявляются у 1% здоровых беременных женщин. Вирусологические методы являются мало эффективными 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 внутриутробного инфицирования. Наличие IgG антител после 6 месячного возраста (после исчезновения материнских антител) также позволяет подтвердить наличие инфекции. Вирусная РНК может быть обнаружена методом ПЦР в течение первых нескольких недель жизни. Материалом для вирусологического исследования являются моча, соскоб со слизистой носоглотки, отделяемое конъюнктивы, фекалии новорожденного.

Диагноз врожденной краснухи ставится в случае обнаружения специфических IgM антител, выявление вирусной РНК в биологических жидкостях и тканях, сохранения IgG антител после шестимесячного 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 женщины 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). Высоко чувствительным методом пренатальной диагностики является выявление ДНК цитомегаловируса в амниотической жидкости методом ПЦР. Исследование IgM антитела к цитомегаловирусу не эффективно для диагностики внутриутробной цитомегалии.

У **новорожденного** для подтверждения инфицирования проводится выявление вирусной ДНК. Материалом для вирусологического исследования служат моча, слюна, кровь, спинномозговая жидкость. Для установления количества возбудителя (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.

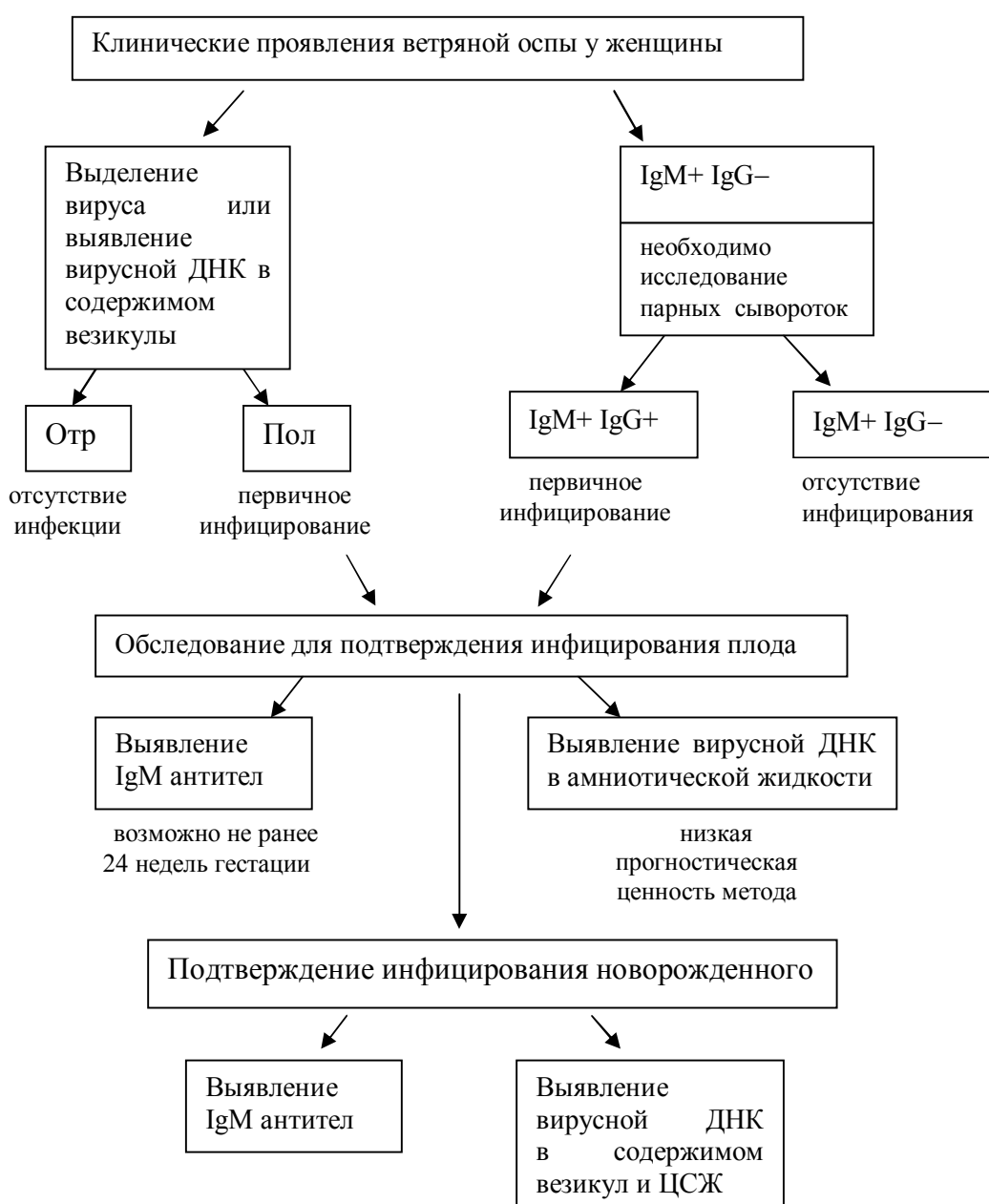
Ветряная оспа

При заболевании ветряной оспой специфические IgM антитела персистируют в крови в течение 4-5 недель, IgG антитела сохраняются пожизненно. Для подтверждения диагноза ветряной оспы используется выявление вируса в содержимом везикулы и наличие сероконверсии IgG антител (алгоритм 4).

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 выявления вируса в содержимом везикул или цереброспинальной жидкости (при поражении ЦНС).

Алгоритм 4 – Диагностика ветряной оспы у беременной женщины и новорожденного



Возможные ошибки и осложнения

При условии правильного использования предложенных алгоритмов ошибки и осложнения исключены.