

recomBlot CMV IgG (Avidity) **recomBlot CMV IgM**



Imunoblot určený k detekci IgG a IgM protilátek proti *Cytomegaloviru* (CMV) v lidském krevním séru nebo plazmě. Reagencie potřebné k určení avidity protilátek k dispozici na vyžádání.

1. Obecné aspekty

recomBlot CMV je kvalitativní *in vitro* test určený k detekci a bezpečné identifikaci IgG a IgM protilátek proti *Cytomegaloviru* v lidském krevním séru nebo plazmě. Je rovněž používán ke confirmaci pozitivních výsledků screeningových testů. Na rozdíl od ELISA nebo bodových testů umožňuje tento test díky elektroforeticky odděleným antigenům identifikaci a lokalizaci specifických protilátek.

2. Cytomegalovirus

Lidský Cytomegalovirus (hCMV) je herpesvirus celosvětově rozšířený v lidské populaci. Je přenášen krevní cestou nebo přímým dotykem se sliznicemi (sexuální, prenatální nebo iatrogenní přenos při transplantaci nebo transfuzi krve).

Obecně je primární infekce během inkubační doby (4-8 týdnů) u imunokompromitovaných jedinců bezpříznaková. Klinické příznaky onemocnění jsou vysoce variabilní a závisí na věku a stavu imunitního systému každého jedince. U pacientů po transplantaci, s AIDS nebo nádory může být CMV infekce vážným a život ohrožujícím onemocněním. Přibližně u 40% případů dochází v průběhu těhotenství intrauterinním přenosem k primární infekci plodu. 10% infikovaných novorozenců pak trpí vážnými poruchami. Plod může být rovněž infikován i vertikálním přenosem.

K orgánovému poškození dochází s různou intenzitou podle cílové skupiny pacientů. hCMV způsobuje smrt buď přímo (CMV retinitida a colitida u pacientů s AIDS) nebo nepřímo změnou vlastností imunitního systému (zvýšení bakteriálních nebo houbových infekcí). Závažnou komplikací je také atypická pneumonie (s vysokou mortalitou) a jen ojediněle zánět mozku. U transplantovaných jedinců může infekce hCMV mít za následek i rejekci orgánů.

3. Diagnostika

Diagnostické metody se v současnosti zaměřují na stanovení CMV-specifických protilátek, detekci viru samotného nebo jeho komponent (např. izolace viru, antigenu pp65, PCR). Která z těchto metod bude použita, závisí na každém konkrétním případě.

Sérologické metody jsou důležité pro diagnostiku hCMV v těchto případech:

- detekce primární infekce u imunokompetentních jedinců
- určení statutu protilátek u dárců a příjemců orgánů či u aloimplantátů
- určení statutu protilátek u dárců krve
- diagnostika v průběhu těhotenství

Screening CMV-specifických protilátek je prováděn ELISA testy, které umožňují jak kvalitativní, tak kvantitativní stanovení humorální imunitní odpovědi. Nicméně tímto testem nelze zachytit typické rozdíly primární a pozdní infekce.

Výhodou *recomBlot* CMV je stanovení reaktivity protilátek proti jednotlivým antigenům. V časně fázi infekce jsou detekovatelné protilátky jak proti proteinům kůže p150 a p65, tak i nestrukturální proteiny IE1 a CM2. Protilátky proti glykoproteinům gB1 a gB2 jsou zpravidla detekovatelné až po 6-8 týdnech primární infekce.

Sérologická diagnostika reaktivity je poněkud omezená. Nicméně, dlouhodobě perzistující vysoký titr IgG protilátek proti p150, membránovým glykoproteinům (gB1, gB2), IE1, CM2 a p65, v kombinaci s pozitivními IgM protilátkami, lze označit jako reaktivaci. Tento výsledek však musí být ověřen pomocí PCR (detekce akutní virémie) nebo detekcí antigenu pp65.

Sérologie klasické infekce je založena na sledování patogen-specifických IgM protilátek, které jsou produkovány jen dočasně, a dlouhodobě přetrvávajících protilátek IgG. Přítomnost IgM protilátek pak svědčí o akutní infekci, zatímco samotné IgG protilátky (již bez IgM titru) dokazují déletrvající infekci. Díky variabilitě imunitní odpovědi a odchylkám v sérologii každého jedince (perzistující, reaktivní nebo opožděně reagující IgM protilátky), může tato klasická metoda v mnoha případech vést ke špatným výsledkům.

Sérologickou diagnostiku lze doplnit stanovením avidity IgG protilátek (celková vaznost populace protilátek proti danému antigenu). Stanovení avidity protilátek je užitečné především díky tomu, že jsou během vývoje imunitní odpovědi průběžně stanovovány zrající IgG protilátky. Čím déle infekce probíhá, tím mají IgG protilátky vyšší aviditu. Nízká avidita tedy indikuje primární infekci, zatímco vysoká avidita je typická pro pozdní fázi infekce nebo reaktivaci.

4. Princip testu

Cytomegalovirus-specifické antigeny (IE1, p150, CM2, p65, gB1 a gB2), použité v tomto testu, jsou získány s pomocí rekombinantních buněk *E.coli*. Purifikované rekombinantní antigeny jsou poté na SDS polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) elektroforeticky separovány podle jejich molekulové váhy. CMV proteiny jsou dále elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózu membránu (Western blot). Membrána je následně inkubována s proteinovým roztokem blokujícím volná vazebná místa, promyta, nastříhána na jednotlivé proužky a ty poté vloženy do zkumavek.

K detekci CMV-specifických protilátek jsou proužky inkubovány se zředěnými vzorky séra. Během inkubace se protilátky přítomné v testovaných vzorcích váží k antigenům na proužcích. Nenavázané protilátky jsou odstraněny promytím a proužky následně inkubovány s anti-lidskými IgG a IgM protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (HRP). Specificky navázané protilátky jsou detekovány peroxidázou katalyzovanou barevnou reakcí. Došlo-li k vazbě protilátky na antigen, objeví se na odpovídajícím místě testovacího proužku tmavý band.

Pro ověření správné inkubace séra jsou na horním konci (pod identifikačním číslem) každého proužku nanášeny anti-lidské imunoglobuliny, které musí být viditelné při reakci s jakýmkoli sérem.

Použití rekombinantní antigeny

Tab.1: Rekombinantní CMV antigeny

Rekombinantní antigen	Otevřený čtecí rámeček/protein	Molekulární váha proteinu (kDa)	Označení proteinu
IE1	UL123/IE1/1	53	Nestrukturní protein, „přímý časný protein“
p150	UL32/pp150	50	Protein kůže
CM2	UL44, UL57/p52 (DBP)	45	Nestrukturní protein
p65	UL83/pp65	31	Protein kůže
gB1	UL55/gB	25	Membránový glykoprotein gB
gB2	UL55/gB	18	Membránový glykoprotein gB

5. Obsah soupravy

recomBlot CMV

Souprava obsahuje reagenty v množství potřebném pro 20 vyšetření. Každá souprava obsahuje:

promývací pufr A (10x koncentrovaný): obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, MIT (0.1%) a Oxypyron (0.2%) jako konzervační látky	100 ml
substrát TMB (tetramethylbenzidin, přímo k použití)	40 ml
mléčný prášek	5 g
inkubační vanička s 10 žlábků	2 ks
kontrolní proužek s vyvinutými bandy, specifický pro danou šarži	1 ks
návod k použití	1 ks
vyhodnocovací formulář	1 ks

5.1. recomBlot CMV IgG

Mimo reagenty uvedené v bodu 5 souprava dále obsahuje:

zkumavka s vzestupně očíslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými CMV antigeny	2 ks
IgG cut-off kontrola: lidského původu, anti-HIV-1/2 a HBsAg negativní, obsahuje MIT (0.1%) a Oxypyron (0.1%) jako konzervační látky, červený vršek	70 µl
IgG konjugát: králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP (100x koncentrovaný), obsahuje NaN ₃ (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (< 0.1%), zelený vršek	500 µl

Pro určení avidity IgG protilátek proti CMV je k soupravě recomBlot CMV IgG na vyžádání k dispozici: Avidity reagens (pevná látka) pro přípravu 60 ml roztoku pro přímé použití

5.2. recomBlot CMV IgM

Mimo reagenty uvedené v bodu 5 souprava dále obsahuje:

zkumavka s vzestupně očíslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými CMV antigeny	2 ks
IgM cut-off kontrola: lidského původu, anti-HIV-1/2 a HBsAg negativní, obsahuje MIT (0.1%) a Oxypyron (0.1%) jako konzervační látky, bílý vršek	70 µl
IgM konjugát: králičí anti-lidské protilátky konjugované s HRP (100x koncentrovaný), obsahuje NaN ₃ (< 0.1%), MIT (< 0.1%) a Chloracetamide (< 0.1%), fialový vršek	500 µl

6. Další potřebné reagenty a vybavení, které nejsou součástí soupravy

Deionizovaná voda, vakuový extrakční systém s odpadní nádobou a desinfekcí na infekční roztoky, mikropipety, plastové pinzety, třepačka, graduovaný odměrný válec, váhy.

7. Informace o testu a reagentech

7.1. Bezpečnostní opatření:

- ❖ Pro přípravu kontrolního séra byla použita krev dárců, ve které byla ověřena nepřítomnost protilátek proti HIV-1/2, HCV a HBsAg. Přesto nelze možnost infekce absolutně vyloučit, je tedy nutné s kontrolami zacházet se stejnou opatrností jako se vzorky sér pacientů.
- ❖ Pracujte v ochranných rukavicích.
- ❖ Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (methyisothiazolone) a Chloracetamide. Vyhněte se kontaktu s kůží a sliznicemi.
- ❖ Všechny reagenty a materiál, který přijde do kontaktu s potenciálně infekčními vzorky, musí být vydesinfikován a autoklávován při 121°C nejméně 1 hodinu.
- ❖ Inkubační vaničku používejte jen jedenkrát.
- ❖ S testovacími proužky zacházejte opatrně pomocí pinzety.

7.2. Zacházení se soupravou

Reagenty skladujte při teplotě 2–8°C, **nezmrazujte**. Všechny komponenty soupravy nechte před použitím nejméně 30 minut temperovat při laboratorní teplotě (18-25°C). Celá procedura je prováděna při laboratorní teplotě.

Identické reagenty (dle tištěných symbolů) mohou být použity u různých imunoblotů a *recomblotů* odpovídající šarže. Dodržujte prosím dobu expirace jednotlivých komponent soupravy.

Kontrolní séra lze použít pouze u čísla šarže uvedeného na obalu soupravy; nelze je používat u souprav jiné šarže.

Před samotnou analýzou testovaná séra a konjugát dobře protřepejte.

Zkumavky obsahující testovací proužky otvírejte teprve těsně před použitím, aby v nich nedocházelo ke kondenzaci vlhkosti. Nepoužité proužky nechte ve zkumavce a dále skladujte při 2–8°C (zkumavku uzavírejte velmi pevně, proužky nesmí zvlhnout!).

Proužky jsou vzestupně očíslovány a označeny zkratkou daného testu.

Cut-off kontrola musí být provedena paralelně s testovanými vzorky, bez ohledu na to, kolik vzorků sér je testováno. Slouží k ověření podmínek testu a správné interpretaci výsledků.

Kvalitu soupravy lze zaručit pouze během doby expirace uvedené na obalu soupravy.

Chraňte veškeré reagenty před přímým slunečním světlem.

Test musí být proveden pouze zaškolenými a kvalifikovanými pracovníky.

Test je vhodný i pro zpracování na automatu. Bližší informace žádejte u svého dodavatele.

7.3. Příprava roztoků

7.3.1. Příprava pracovního ředění promývacího pufru A

Pufry jsou používány nejen k promývání, ale i k ředění vzorků séra a konjugátu. Podle počtu testovaných proužků připravte odpovídající objem promývacího pufru A (viz tabulka 2). Nejprve rozpusťte mléčný prášek v koncentrátu promývacího pufru A a pak ke směsi přilijte deionizovanou vodu (ředění 1+9). Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebný objem promývacího pufru dopočítat.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny. Pracovní ředění promývacího pufru A je mírně zakalené a bez zápachu.

Tab. 2: Příprava promývacího pufru A

Použitý proužek	Mléčný prášek	Koncentrovaný promývací pufry A	Deionizovaná voda	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	0.1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0.2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0.3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0.5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1.5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

7.3.2. Příprava roztoku konjugátu

Roztok konjugátu musí být připraven těsně před použitím. Pracovní ředění roztoku konjugátu není možné dále skladovat.

1 díl koncentrovaného IgG, respektive IgM konjugátu se ředí se 100 díly pracovního ředění promývacího pufru A (1+100).

Potřebná množství jednotlivých roztoků udává tabulka 3. Testujete-li jiný počet proužků, než je uvedeno v tabulce, je nutné potřebné objemy daných roztoků dopočítat.

Tab. 3: Objemy pro ředění anti-lidského IgG a IgM konjugátu

Použité proužky *	Koncentrovaný IgG nebo IgM konjugát	Pracovní ředění promývacího pufru A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml

* Objemy jsou počítány bez „mrtvého objemu“. Připravujte proto roztok konjugátu pro 1-3 proužky navíc v závislosti na způsobu zpracovávání testu (ručně nebo na automatu).

7.3.3. Roztok substrátu

Roztok substrátu je připraven k přímému použití. Před použitím jej vytemperujte na laboratorní teplotu (18-25°C).

Je nutné vyvarovat se kontaminaci roztoku substrátu, např. použitím kontaminované špičky, neboť by se tak ovlivnila citlivost testu.

7.4. Skladování a stabilita

Reagencie skladujte při 2-8°C.

Pracovní ředění promývacího pufru A může být při 2-8°C skladováno 4 týdny.

Roztok konjugátu musí být připraven vždy čerstvý.

8. Vzorky

Jako vzorek lze použít krevní sérum nebo plazmu, které byly co nejdříve po odebrání separovány od koagula. Tepelně inaktivované vzorky způsobují zvýšenou reaktivitu pozadí testu. Za všech okolností předcházejte mikrobiální kontaminaci vzorků. Nerozpustné částice je nutné ze vzorků odstranit ještě před jejich inkubací. Lipemická, hemolytická nebo zakalená séra způsobují ztmavnutí pozadí testu *recomBlot* CMV. Mohou rovněž poskytovat falešné výsledky, proto nesmí být používány.

Upozornění!

Nemůžete-li test provést okamžitě, mohou být vzorky skladovány při teplotě 2-8°C až 2 týdny. Dlouhodoběji je lze skladovat při minimální teplotě -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování vzorků není doporučováno, neboť se tím ovlivňuje kvalita výsledků.

9. Pracovní postup

9.1. Obecné informace

Reprodukovatelnost výsledků závisí především na preciznosti promývání proužků (postup promytí uveden v bodech 9.3. a 9.5.).

9.2. Inkubace vzorku

1. 1 inkubační žlábek je určen pro 1 testované sérum. Do každého žlábků napipetujte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A. Plastovou pinzetou opatrně ponořte testovací proužek do příslušného žlábků naplněného promývacím pufrem. Číslo proužku musí směřovat vzhůru.

Upozornění! Testovací proužek musí být do promývacího pufru zcela ponořen.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo zkumavky s použitými testovacími proužky a číslo každého proužku.

2. Přidání vzorků

IgG/IgM test: Do příslušných žlábků napipetujte **20 µl** neředěného vzorku - lidské sérum nebo plazma (**ředění 1 + 100**).

Dbejte na to, abyste vzorek přidávali u konce proužku ponořeného v promývacím pufre A, a co možná nejdříve opatrně promíchali.

Do vyhodnocovací tabulky zaznamenejte číslo vzorku a třídu imunoglobulinů (IgG, IgM).

Inkubační misku přikryjte víčkem a za jemného třepání při laboratorní teplotě **1 hodinu** inkubujte.

Upozornění! Dbejte na to, aby se roztoky nedostaly do jiných žlábků. Víčko otevírejte a zavírejte opatrně, aby jednotlivé roztoky nevystříkly ven ze žlábků (riziko křížové kontaminace).

9.3. Promytí

1. Po uplynutí inkubační doby opatrně odstraňte plastové víčko.
2. Zředěné sérum ze žlábků opatrně odsajte.

Upozornění! Odsávejte roztoky ze žlábků vždy čistou špičkou nebo špičky vždy řádně promyjte deionizovanou vodou. Používáte-li promývačku, řiďte se pokyny výrobce.

3. Následně do každého žlábků přidejte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A a za jemného třepání **5 minut** inkubujte. Poté pufr odsajte.
4. Promytí dle bodu 3 opakujte ještě **tříkrát**.

9.4. Inkubace s konjugátem

Po promytí proužků do každého žlábků přidejte **2 ml** připraveného **roztoku konjugátu** (viz tabulka 3). Za jemného třepání při laboratorní teplotě **45 minut** inkubujte. Během inkubace musí být žlábků zakryty plastovým víčkem.

9.5. Promytí

Roztok konjugátu ze žlábků odsajte a proužky opět promyjte (viz bod 9.3).

9.6. Reakce substrátu

Do každého žlábků přidejte **1.5 ml roztoku substrátu** a za jemného třepání inkubujte při laboratorní teplotě **5-15 minut**.

Kontrolujte průběh barevné reakce. Proužky v roztoku substrátu inkubujte, dokud se na proužku inkubovaném s cut-off kontrolou neobjeví band p150.

U vysoce pozitivních sér může být barevná reakce příliš intenzivní. U těchto proužků proto doporučujeme zastavit barevnou reakci dříve.

9.7. Zastavení reakce

1. Po odsátí roztoku substrátu proužky třikrát promyjte deionizovanou vodou.
2. Plastovou pinzetou proužky opatrně vyjměte, umístěte je mezi dvě vrstvy absorbčního papíru a nechte 2 hodiny sušit. Suché proužky vlepíte do vyhodnocovací tabulky a odečtené výsledky zapišete do protokolu.
3. Proužky by měly být uchovávány na temném místě.

9.8. Určení avidity protilátek

Postup testu pro stanovení avidity protilátek je detailně popsán v návodu na použití avidity reagentu.

10. Souhrn pracovního postupu

1.	Vytemperujte všechny reagenty na laboratorní teplotu.
2.	Vložte proužky do 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A a zkontrolujte, zda jsou v pufru zcela ponořeny.
3.	Přidejte 20 µl vzorku, respektive cut-off kontrol.
4.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 1 hodinu inkubujte.
5.	Na třepače třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A.
6.	Přidejte 2 ml odpovídajícího roztoku konjugátu.
7.	Za jemného třepání při laboratorní teplotě 45 minut inkubujte.
8.	Na třepače třikrát po pěti minutách promývejte 2 ml pracovního ředění promývacího pufru A.
9.	Přidejte 1.5 ml roztoku substrátu a za jemného třepání při laboratorní teplotě inkubujte 5–15 minut (bandy viz bod 9.6).
10.	Proužky promyjte nejméně třikrát deionizovanou vodou.
11.	Proužky nechte mezi 2 vrstvami absorbčního papíru 2 hodiny sušit a poté odečtěte výsledky.

11. Vyhodnocení

11.1. Vyhodnocení intenzity bandů

1. Cut-off kontrola musí být provedena paralelně s testovanými vzorky, bez ohledu na to, kolik vzorků sér je testováno. Reaktivita cut-off kontroly slouží k odlišení reaktivity specifických protilátek a reaktivity pozadí.
2. Do přiložené vyhodnocovací tabulky zapišete datum, šarži, číslo zkumavky a detekovanou podtřídou protilátek.
3. Dále zapišete identifikační čísla vzorků.
4. Přilepte jednotlivé proužky na odpovídající pole vyhodnocovací tabulky tak, aby band kontroly reakce byl na vyznačené linii. Proužek poté transparentní lepicí páskou nalevo od této linie zafixujte. Pokud byste proužek přilepili lepidlem nebo lepicí páskou po celé délce, zbarvení jednotlivých bandů by vymizelo.
5. Kontrolní proužek s označenými názvy jednotlivých bandů přiložte k fixovaným proužkům tak, aby bandy kontroly reakce byly v jedné linii. Kontrolní proužek je specifický pro danou šarži a pochází ze stejného nitrocelulóзовého pásu jako proužky testovací. Jsou na něm vyznačeny molekulové váhy a názvy jednotlivých antigenních bandů.

6. Intenzita bandů je určována v porovnání s cut-off kontrolou pro každou třídu imunoglobulinů zvlášť (viz 11.2, respektive tab. 4). Zjištěné bodové hodnoty zapište do protokolu.

11.2. Kontrola výsledků

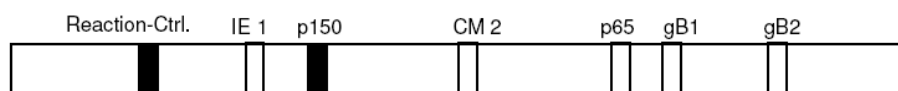
Cut-off kontrola musí být provedena paralelně s testovanými vzorky. Slouží k ověření podmínek testu (citlivosti) a ke confirmaci reaktivity protilátek s jednotlivými antigenními bandy. Poloha bandů musí být u testovacích proužků shodná s proužkem kontrolním (specifický pro danou šarži).

Kontrolní band (kontrola reakce) nejbližší pod číslem proužku slouží k ověření správného provedení testu. Musí být zřetelně zbarvený.

Proužky inkubované s cut-off kontrolou musí vykazovat následující sestavu bandů:

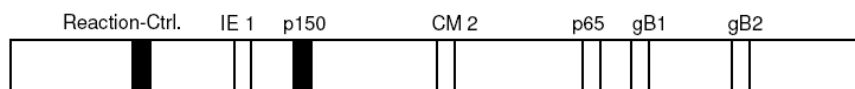
- **IgG cut-off kontrola**

Musí být viditelný band kontroly reakce a p150.



- **IgM cut-off kontrola**

Musí být viditelný band kontroly reakce a p150.



K vyhodnocení intenzity bandů (jak u IgG, tak IgM testu) slouží jako referenční band p150.

Tab. 4: Vyhodnocení intenzity bandů

Bandy	Intenzita
negativní	-
velmi slabá intenzita (slabší než u p150 bandu cut-off kontroly)	±
slabá intenzita (stejná jako u p150 bandu cut-off kontroly)	+
silná intenzita (silnější než u p150 bandu cut-off kontroly)	2+
velmi silná intenzita	3+

11.3. Výsledky a interpretace testu

Imunitní odpověď člověka na CMV infekci je vysoce variabilní. Interpretace sérologických výsledků je poněkud obtížnější, především díky tomu, že IgM protilátky mohou přetrvávat řadu let po prodělané infekci a že primární infekce může indukovat jen velice nízké nebo až nedetekovatelné titry IgM protilátek.

Proto k vyhodnocení CMV imunitního statutu musí být hodnoceny výsledky IgG i IgM testu současně.

11.3.1. Interpretace výsledků IgG testu

Tab. 5: Vyhodnocení bandů u IgG testu

<ul style="list-style-type: none"> • žádné specifické CMV bandy • velice slabě intenzivní bandy (odpovídající ±) • buď samostatný slabě intenzivní p65 band (odpovídající +) nebo dohromady s dalšími bandy, které vykazují velmi slabou intenzitu (odpovídající ±) 	IgG negativní
<ul style="list-style-type: none"> • přinejmenším slabě intenzivní p150 band (odpovídající +), obvykle jsou viditelné i další bandy • p150 negativní, ale CM2 je velmi silně intenzivní (odpovídající 2+) a je viditelný přinejmenším ještě jeden band slabé intenzity (odpovídající +) 	IgG pozitivní
<ul style="list-style-type: none"> • všechny ostatní schémata 	IgG hraniční

11.3.2. Interpretace výsledků IgM testu

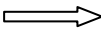
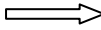
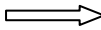
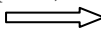
Tab. 6: Vyhodnocení bandů u IgM testu

<ul style="list-style-type: none"> • žádné specifické bandy • velice slabě intenzivní bandy (odpovídající ±) • samostatný slabě intenzivní (odpovídající +) band (mimo p150 bandu) • buď samostatný slabě intenzivní p65 band (odpovídající +) nebo dohromady s dalšími bandy, které vykazují velmi slabou intenzitu (odpovídající ±) 	IgM negativní
<ul style="list-style-type: none"> • přinejmenším slabě intenzivní p150 band (odpovídající +) a alespoň jeden jeden band slabé intenzity (odpovídající +) • samostatný velmi silně intenzivní band p150 (odpovídající 2+) 	IgM pozitivní
<ul style="list-style-type: none"> • všechny ostatní schémata 	IgM hraniční

11.3.3. Shrnutí interpretace výsledků testu

Výsledky testu jsou většinou vyhodnocovány následovně:

Berte prosím v úvahu možné odchylky od typického vývoje imunitní odpovědi, ke kterým může dojít ve zvláštních případech. Je nutné je zahrnout do interpretace výsledků testu (viz 12.2 a 12.3).

- *recomBlot* CMV IgG pozitivní, reaktivita k **gB2 negativní** (možná reaktivita vůči gB1)
recomBlot CMV IgM pozitivní nebo negativní
 lze očekávat: **primární infekci - je doporučováno stanovit ještě aviditu protilátek (nízká avidita protilátek poukazuje na infekci ne starší než 14 týdnů, viz 11.4.2)**
 nebo **CMV infekci starší při nejmenším 6-8 týdnů (gB2 negativní)**
 Pro upřesnění jedné z těchto možností by měla být stanovena avidita protilátek (viz 10.3).
- *recomBlot* CMV IgG pozitivní, **reaktivita vůči p150 a gB2 negativní**
recomBlot CMV IgM pozitivní
 lze očekávat **primární infekci ne starší než 6-8 týdnů**
- *recomBlot* CMV IgG pozitivní, **gB2 band** alespoň slabě intenzivní (pozitivní nebo negativní reaktivita vůči bandu gB1)
recomBlot CMV IgM pozitivní (reziduální titer IgM) nebo již negativní
 lze očekávat **CMV infekci starší nejméně 6-8 týdnů**
- *recomBlot* CMV IgG pozitivní, izolovaný **p150 band** (reaktivita protilátek i vůči gB1 a/nebo gB2)
recomBlot CMV IgM většinou negativní (je-li pozitivní, jedná se o perzistentní titer IgM protilátek proti p150)
 lze očekávat **dřívější CMV infekci (obvykle starší 6ti měsíců)**

Díky přirozené variabilitě imunitní odpovědi - zejména u imunosuprimovaných pacientů, je při stanovení konečné diagnózy nutno brát zřetel především na klinické projevy (v souladu se sérologickými výsledky) každého pacienta.

11.4. Poznámky k interpretaci testu

- Protilátky proti p150 jsou obvykle tvořeny při každé CMV infekci, nevyskytují se však bezprostředně po primární infekci.
- Při primární infekci lze detekovat jak IgG protilátky proti p150, tak i proti IE1, CM2 a p65. Nejsou však přítomny protilátky proti glykoproteinům (gB1, gB2). Titer IgM protilátek je obvykle pozitivní (přetrvávají 6-12 týdnů).
- IgG protilátky reaktivní pouze vůči p150 a glykoproteinům (gB1 a/nebo gB2) a negativní titer IgM protilátek jsou typické pro dlouhotrvající infekce (obvykle starších než 6 měsíců).
- Protilátky proti gB1 se mohou objevit dříve než za týden, naproti tomu protilátky proti gB2 jsou detekovány nejdříve po 6-8 týdnech. Přítomnost anti-gB2 protilátek vylučuje primární infekci.
- Sérologická diagnostika reaktivace je poněkud omezená. Nicméně, dlouhodobě perzistující vysoký titer IgG protilátek proti p150, membránovým glykoproteinům (gB1, gB2), IE1, CM2 a p65, v kombinaci s pozitivními IgM protilátkami, lze označit jako reaktivaci. Tento výsledek však musí být ověřen detekcí antigenu pp65 nebo pomocí PCR (detekce akutní virémie).
- Díky přirozené variabilitě imunitní odpovědi, musí být sérologické výsledky interpretovány vždy v souladu s klinickými projevy pacienta. Nejasné nebo hraniční výsledky musí být ověřeny s novým vzorkem séra.

Tmavě zbarvené testovací proužky:

Séra některých pacientů (např. s alergií na mléčné proteiny) mohou vytvářet tmavé zbarvení celého nitrocelulóзовého pásu. Tento efekt je vyvolán mnoha různými faktory v séru každého pacienta. Vyhodnocení proužků je pak obvykle možné pouze s určitou restrikcí. Např. „inverzní bandy“ (bílé bandy na tmavém pozadí) jsou hodnoceny jako negativní. Dané sérum však musí být v každém případě testováno znovu jinými sérologickými metodami.

10.3. Rozšiřující vyšetření – určení avidity protilátek

Určení avidity IgG protilátek je možné s pomocí avidity reagentu.

RecomBlot CMV umožňuje stanovovat reaktivitu protilátek proti jednotlivým antigenům zvlášť. Aviditu daných protilátek lze tedy posuzovat odděleně, což je důležitý aspekt, neboť během zrání protilátek se jejich avidita mění. Určení avidity protilátek proti IE1, p150 a CM2 přináší doplňkové informace o časové fázi infekce. Primární infekce obvykle vykazují nízké aviditní protilátky proti IE1, p150 a CM2, zatímco vysoce aviditní protilátky proti těmto antigenům (jsou-li přítomny) jsou charakteristické pro pozdní fázi infekce.

10.3.1. Princip a postup testu

Postup testu pro stanovení avidity protilátek je detailně popsán v návodu na použití avidity reagentu. Určení avidity protilátek je možné s pomocí *recomBlot CMV IgG* soupravy.

10.3.2. Interpretace výsledků stanovení avidity protilátek

- Porovnejte intenzitu odpovídajících bandů u dvou testovacích proužků inkubovaných se stejným sérem (IgG proužek a proužek avidity). Zkontrolujte, zda se intenzita zbarvení změnila. Reaktivitu protilátek na IgG proužku nižší než u cut-off kontroly (velmi slabá intenzita) nelze brát v úvahu.
- U vysoce aviditních protilátek se intenzita bandů na proužku avidity nesnižuje vůbec nebo jen velmi málo (intenzita bandů je v rozmezí 75-100% oproti intenzitě bandů na IgG proužku). Naopak při nízké aviditě protilátek se intenzita bandů snižuje minimálně o 50%.
- Pro diagnostické účely lze využívat pouze aviditu protilátek proti IE1, p150 a CM2. U p65 je avidita protilátek během jejich zrání vysoce variabilní, k tomuto účelu jsou tedy nevhodné. Avidita anti-gB1 a anti-gB2 protilátek má sekundární význam, především nejsou-li přítomny protilátky proti gB2. Výsledky testu by v takovém případě měli být ověřeny stanovením avidity protilátek.
- Kompletní nebo zřetelné snížení avidity (nízká avidita) nejméně u dvou z anti-IE1, anti-p150 nebo anti-CM2 protilátek s vysokou pravděpodobností značí primární infekci (ne déle než 14 dnů).
- Naopak vysoká avidita alespoň u dvou z těchto relevantních protilátek (anti-IE1, anti-p150 a anti-CM2) svědčí o pozdní fázi infekce (starší minimálně 6-8 týdnů).
- Je nutno brát v úvahu, že proces dozrávání protilátek je plynulý. Není tedy vyloučen souběžný výskyt jak nízké, tak vysoce aviditních protilátek (mezi 6-14 týdny od infekce). Séra některých pacientů vykazují vysoce aviditní protilátky již po 6-8 týdnech, zatímco jiní pacienti mají protilátky s nízkou aviditou až do konce 14 týdne od počátku infekce.
- Střední avidita protilátek (intenzita bandů je 50-75% intenzity bandů u IgG proužku) nepodává žádné doplňkové informace o časové fázi infekce.
- Pro vyhodnocení avidity protilátek nelze definovat žádné absolutně platné pravidlo. Jestliže dřívější infekce vykazovaly nízké aviditní protilátky, musí být bráno v úvahu opožděné dozrávání avidity protilátek.
- Zjištěná avidita protilátek musí být interpretována vždy ve spojení s celkovými výsledky testu. Pokud jsou výsledky testu nejasné nebo hraniční, doporučuje se test po 2-3 týdnech zopakovat s novým vzorkem séra.

12. Klinické výsledky**12.1. Citlivost a specifita****12.1.1. IgG**

Celkově bylo pomocí *recomBlot CMV IgG* testu vyšetřeno 548 sér a výsledky poté porovnávány s komerčně dostupnými ELISA sety. Soubor obsahoval vzorky z rutinní diagnostiky: 15 vzorků s probíhající CMV infekcí (z celkových 63), 7 sérokonverzních (z celkových 38), 98 sér, u kterých byly již dříve diagnostikovány IgM protilátky a 145 potenciálně problematických vzorků sér (autoimunitní onemocnění, těhotenství, primární EBV infekce, žloutenkové, hemolytické nebo lipemické séra).

IgG	ELISA CMV IgG			
		pozitivní	negativní	hraniční
<i>recomBlot</i> CMV IgG	pozitivní	327	4	1
	negativní	2	193	10
	hraniční	0	8	2

Hraniční výsledky nebyly zahrnuty do hodnocení citlivosti a specifity testu.

Výsledky srovnání s použitým komerčním ELISA setem:

Specifita: $193 / (4 + 193) \times 100 = 98.0\%$

Citlivost: $327 / (327 + 2) \times 100 = 99.4\%$

U 25 testovaných vzorků sér (4.4%), včetně hraničních výsledků, byly prokázány nesrovnalosti s ELISA testem:

Zhruba polovina vykazovala silnější reaktivitu u *recomBlotu* CMV; většina těchto výsledků vyznívá ve prospěch *recomBlot* CMV, jelikož se jedná o vzorky sér s probíhající CMV infekcí.

Druhá polovina sporných výsledků naopak vykazovala u *recomBlotu* CMV nižší reaktivitu než v ELISA testu. Všechna séra však byla u spodního detekčního limitu IgG titru, jedná se tedy o odchylky v rámci „cut-off“ rozmezí.

12.1.2. IgM

Pomocí *recomBlot* CMV IgM testu vyšetřeno 557 sér a výsledky poté porovnávány s komerčně dostupnými ELISA sety. Soubor testovaných vzorků až na pár výjimek odpovídal IgG souboru.

IgM	ELISA CMV IgM			
		pozitivní	negativní	hraniční
<i>recomBlot</i> CMV IgM	pozitivní	174	20	11
	negativní	3	308	2
	hraniční	5	28	7

Hraniční výsledky nebyly zahrnuty do hodnocení citlivosti a specifity testu.

Výsledky srovnání s použitým komerčním ELISA setem:

Specifita: $308 / (20 + 308) \times 100 = 93.9\%$

Citlivost: $174 / (174 + 3) \times 100 = 98.3\%$

Silnější reaktivita než u ELISA testu byla zaznamenána celkem u 58 vzorků: ELISA negativní/*recomBlot* CMV pozitivní (19); ELISA negativní/*recomBlot* CMV hraniční (28); ELISA hraniční/*recomBlot* CMV pozitivní (11).

Zhruba ¾ těchto výsledků vyznívá ve prospěch *recomBlot* CMV, např. průběžné vysoce pozitivní IgG titry, reaktivity, nedávná primární infekce. V těchto případech se u některých vzorků může objevit i titr IgM protilátek, pravděpodobně díky vyšší citlivosti IgM blotu.

Přibližně 15 vzorků určených *recomBlot* CMV jako reaktivních bylo buď IgG-positivních se zbytkovým titrem IgM protilátek nebo IgG-negativních s nespecifickou IgM reakcí.

10 vzorků sér vykazovalo u *recomBlot* CMV nižší reaktivitu než v ELISA testu: ELISA pozitivní/*recomBlot* CMV hraniční (5) nebo negativní (3), ELISA hraniční/*recomBlot* CMV negativní (2).

Hraniční/pozitivní IgM výsledek v ELISA testu lze vysvětlit díky tomu, že 7 z těchto sér bylo sérokonverzních nebo s probíhající CMV infekcí; zbývající 3 vzorky vyžadují další vyšetření.

12.2. Vyhodnocující údaje pro určení data infekce

Studie byla prováděna s 258 vzorky sér. Výsledky jsou následující:

12.2.1. IgG reaktivita k gB

Zhruba u 17% vzorků byly IgG protilátky proti gB prokázány již dříve než za 6 týdnů. Protilátky proti gB2 se většinou neobjevují dříve než za 6-8 týdnů po primární infekci. Pouze v jednom případě byly tyto protilátky prokázány dříve. Přítomnost protilátek proti gB2 s vysokou pravděpodobností vylučuje infekci v rámci prvních 6-8 týdnů.

12.2.1. Nereaktivní IgG protilátky proti p150 u primární infekce

U 29% vzorků nebyla v časně fázi infekce prokázána žádná reaktivita IgG protilátek proti p150 (IgG reaktivita je jinak pozitivní). Protilátky proti p150 se zpravidla tvoří během 6-8 týdnů od začátku infekce (v 19ti z 20ti případů). I přesto, že IgG protilátky proti p150 u jednoho případu chyběly, jejich přítomnost dokazuje primární infekci (během prvních 6-8 týdnů).

12.2.3. Reaktivita IgG protilátek proti izolovanému proteinu p150 (případně i protilátky proti gB1 a/nebo gB2) z dřívější infekce

Izolované IgG protilátky proti p150 (bez jakékoli reaktivity vůči IE1, CM2 a p65) a protilátky proti gB1 a/nebo gB2 jsou charakteristické pro pozdní infekci. Studie prokázala pouze 1 vzorek, u kterého se toto schéma protilátek objevilo, a to až ve 24. týdnu trvání infekce). Přesto však přítomnost proti IgG protilátek proti p150, gB1 a/nebo gB2 indikuje pozdní infekci (minimálně 6 měsíců od infekce).

12.3. Vyhodnocující údaje k aviditě protilátek

Stanovení IgG a IgM protilátek i určení jejich avidity bylo provedeno ve spřízněné laboratoři. Výsledky byly porovnávány s komerčně dostupným ELISA testem (postup dle uvedené metodiky).

Celkem bylo hodnoceno 237 vzorků sér pocházejících od dárců krve (CMV ELISA pozitivní alespoň 2 roky); sérokonverze odpovídá primární infekci. Počátek infekce byl definován jak podle prvního pozitivního séra, tak podle prvních klinických příznaků.

18 sér s negativními nebo hraničními výsledky byly vyloučeny z tohoto hodnocení.






Nízká avidita minimálně u 2 ze tří relevantních protilátek (IE1, p150, CM2) prokázala u 96.3% případů (77/80) primární infekci (během posledních 14 dnů).

Vysoká avidita minimálně u 2 ze tří relevantních protilátek (IE1, p150, CM2) prokázala u 98.4% případů (57/58) pozdní infekci (více než 6-8 týdnů).

13. Literatura

- (1) Brennan, D. C.: **Cytomegalovirus in renal transplantation.** J. Am Soc Nephrol 2001 Apr., 12(4): 848-55.
- (2) Jahn, G., V.C. Scholl, B. Traupe, et al.: **The two major phosphoproteins (pp65 and pp150) of human Cytomegalovirus and their antigenic properties.** J. Gen. Virol. 68 (1987) 1327-1337.
- (3) Landini, M. P., A. Ripalti, K. Sra, et al.: **Human Cytomegalovirus structural proteins: Immune reaction against pp150 synthetic peptides.** J. Clin. Microbiol. 29 (1991) 1868-1872.
- (4) Weber, B., Prosser, F., Munkwitz, A., Doerr, H. W.: **Serological diagnosis of Cytomegalovirus infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody.** Clin. Diagn. Virology, 2 (1994): 245-259.
- (5) Lazzarotto, T.; Galli, C.; Pulvirenti, R.; Rescaldani, R.; Vezzo, R.; La Gioia, A.; Martinelli, C.; La Rocca, S.; Agresti, G.; Grillner, L.; Nordin, M.; van Ranst, M.; Combs, B.; Maine, G.T.; Landini, M.P.: **Evaluation of the Abbott AxSYM Cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) assay in conjunction with other CMV IgM tests and a CMV avidity assay.** Clin. Diagn. Lab Immunol 2001 Jan., 8(1): 196-8.
- (6) Loenen, W.A., Bruggeman, C.A., Wiertz, E.J.: **Immune evasion by human Cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology.** Semin. Immunol. 2001 Feb.; 13(1): 41-9.
- (7) Mach, M.; Kropff, B.; Dal Monte, P.; Britt, W.: **Complex formation by human Cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73).** J. Virol 2000 Dez.; 74(24): 11881-92.
- (8) Preiser, W.; Brauningner, S.; Schwerdtfeger, R.; Ayliffe, U.; Garson, J.A.; Brink, N.S.; Franck, S.; Doerr, H.W.; Rabenau, H.F.: **Evaluation of diagnostic methods for the detection of Cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants.** J. Clin. Virol. 2001 Jan.; 20(1-2): 59-70.
- (9) Prosch, S.; Reinke, P.; Volk, H.D.; Kruger, D.H.: **Zytomegalievirusinfektionen bei Patienten nach Organtransplantation. Epidemiologie, Diagnostik, Therapie.** Internist (Berl.) 2000 Nov.; 41(11): 1253-60; 1262.
- (10) Reimer K., Meisel H.: **Humanes Zytomegalievirus.** in: T. Porstmann (Hrsg.) Diagnostische Bibliothek, Band 1; Virusdiagnostik, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin.Wien 1996, 258-278.
- (11) Thomas L.: **Cytomegalievirus,** in Labor und Diagnose, 5. Auflage, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 1998; S.1262- 1263.
- (12) Trincardo, D. E., Rawlinson, W. D.: **Congenital and perinatal infections with Cytomegalovirus.** J. Paediatr Child Health 2001 Apr., 37(2): 187-92.
- (13) Vornhagen R., W. Hinderer, B. Plachter, G. Jahn, T.H. The and H.-H. Sonneborn **Construction of recombinat autologous fusion proteins which enables IgG-specific serodiagnosis of past HCMV-infection.** Biotest Bulletin 5 1995, 221-227.
- (14) Vornhagen Rolf, Bodo Plachter, Walter Hinderer, T.Hauw The, Jacoba van Zanten, Lukas Matter, Christian A. Schmidt, Hans-H. Sonneborn and Gerhard Jahn **Early Serodiagnosis of Acute Human Cytomegalovirus Infection by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Recombinat Antigens.** Journal of Clinical Microbiology 1994, 981-986.
- (15) Vornhagen Rolf, Walter Hinderer, Hans-H. Sonneborn, Gregor Bein, Lukas Matter, T. Hauw The, Gerhard Jahn and Bodo Plachter **The DNA-Binding Protein pUL57 of Human Cytomegalovirus Is a Major Target Antigen for the Immunoglobulin M Antibody Response during Acute Infection.** Journal of Clinical Microbiology 1995, 1927-1930.
- (16) Vornhagen Rolf, Walter Hinderer, Hans-H. Sonneborn, Gregor Bein, Lukas Matter, T. Hauw The, Gerhard Jahn and Bodo Plachter **Immunoglobulin A-Specific Serodiagnosis of Acute Human Cytomegalovirus Infection by Using Recombinat Viral Antigens.** Journal of Clinical Microbiology 1996, 1020-1023.
- (17) Sipewa M. J., Goubau P., Bodéus M.: **Evaluation of a Cytomegalovirus Glycoprotein B recombinant Enzyme Immunoassay to discriminate between a recent and a past infection.** Journal of Clinical Microbiology 2002, 3689-3693.
- (18) Lazzarotto T., Varani S., Guerra B., Nicolosi A., Lanari M., Landini M. P.: **Prenatal indicators of congenital Cytomegalovirus infection.** J. Pediatrics 2000, 90-95.
- (19) Lazzarotto T., Spezzacatena P., Varani S., Gabrielli L., Pradelli P., Guerra B., Landini M. P.: **Anticytomegalovirus (Anti-CNV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection.** Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1999, 127-129.

14. Vysvětlivky symbolů

	Počet testů v soupravě
EVALFORM	Vyhodnocovací formulář
INSTRU	Návod k použití
	Podívejte se do pracovního postupu
CONT	Obsah soupravy
IVD	<i>In vitro</i> diagnostická souprava
LOT	Číslo šarže
	Nezmrazujte
REF	Katalogové číslo
	Použitelné do uvedené doby expirace
	Teplotní limitace. Skladujte při x-y°C

15. Kontakty

Výrobce:

ALL.DIAG

10, rue Ettore Bugatti – BP6

67038 Strasbourg Cedex 2

tel: 03 88 78 80 88, fax: 03 88 78 76 78

www.alldiag.com; info@alldiag.com

Dodavatel:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno

Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114

email: laboserv@laboserv.cz

http://www.laboserv.cz