

recomLine Parvovirus B19 IgG (Avidita)

recomLine Parvovirus B19 IgM

Přímá imunoanalýza využívající rekombinantní antigeny k detekci IgG a IgM protilátek proti Parvoviru B19 v lidském krevním séru nebo plazmě.

1. OBECNÝ ÚVOD

RecomLine Parvovirus B19 je kvalitativní *in vitro* test ke stanovení IgG a IgM protilátek proti Parvoviru B19 v lidském séru a plazmě.

Díky jednotlivě řazeným rekombinantním antigenům test umožňuje identifikovat protilátky specifické proti jednotlivým antigenům Parvoviru B19. Na rozdíl od ELISA metod poskytuje *recomLine Parvovirus B19* i informace o stádiu infekce.

2. PARVOVIRUS B19

Parvovirus B19 je jedno řetězcový DNA virus s lineárním genomem o délce 5.1 Kb. Jeho povrch je tvořen proteinovou schránkou, která se skládá ze dvou polypeptidů VP-1 (84 kDa) a VP-2 (58 kDa). Oba proteiny jsou kódovány jedním čtecím rámcem na genomu viru, což znamená, že oba proteiny jsou identické s výjimkou 26 kDa N-terminálního segmentu proteinu VP-1. Kódován je i hlavní nestrukturální protein (NS-1), který virus vyžaduje pro svoji replikaci a propagaci.

Parvovirus B19 se primárně replikuje v erythropoetických prekurzorových buňkách, u nichž způsobuje lyzi. Proto se v závislosti na imunologické kompetenci může vyskytovat více nebo méně výraznější anémie. K přenosu viru obvykle dochází kapénkovou infekcí. Díky relativně vysoké stabilitě proteinového kapsidu viru je možná i infekce krví a krevními produkty. Parvovirus B19 je rozšířen po celém světě. Kolem 60–70 % světové populace je tímto virem infikována.

KLINIKA

Nejčastějším klinickým projevem je infekční erytém, také znám jako pátá nemoc (typické dětské onemocnění). Další relativně mírný prodromální symptom, typický exantém, se projevuje po 1 až 2 týdnech, což je obvykle doprovázeno symptomy obdobnými jako u chřipky. Exantém se nejprve vyskytuje na tváři a během několika dnů se rozšiřuje po celém těle.

Asi u 50% dospělých probíhá infekce Parvovirem B19 asymptomaticky. V některých případech se vyskytují symptomy podobné chřipce. Mezi další komplikace, které se mohou vyskytnout, patří artralgie a artritida. Ženy těmito komplikacemi trpí dvakrát tak častěji jako muži. Ve většině případů symptomy vymizí během dvou až čtyř týdnů. Na druhou stranu se v několika případech může stát, že se symptomy po mnoho let opakovaně vrací. Z tohoto důvodu je pro objasnění chronických artopatií nutné zvážit perzistentní infekci Parvovirem B19.

Doba trvání množení viru je omezena díky vzniku specifických protilátek. Proto infekce a zánik erythropoetických prekurzorových buněk nezpůsobuje žádné vážné komplikace. Ovšem u pacientů s hemolytickou anémií může vyústit v život ohrožující aplastickou krizi.

U infekcí vyskytujících se u těhotných žen, může dojít k transplacentálnímu přenosu Parvoviru B19 na plod (asi u 20%). Protože doba přežití erytrocytů je až do 20. týdne těhotenství krátká a účinná imunitní odpověď chybí, může infekce způsobit těžkou akutní nebo chronickou anémii a vést k samovolnému potratu. Jinou komplikací díky infekci Parvovirem B19 během druhého trimestru je tvorba hydrops fetalis, který, pokud není léčen, může zapříčinit smrt embrya.

U imunodeficientních osob může infekce Parvovirem B19 vést ke vzniku chronické anémie, protože virus není kompletně eliminován. Nicméně tento typ anémie má mnohem mírnější průběh ve srovnání s aplastickou krizí u anemických pacientů.

Další orgánové projevy jako jaterní dysfunkce, respirační choroby, s Parvovirem B19 spojená myokarditida atd. byly popsány teprve nedávno.

V některých případech je chronická anémie a artopatie způsobena persistentní infekcí Parvovirem B19 u pacientů bez známého imunitního poškození.

3. DIAGNÓZA

Primární infekce Parvovirem B19 se vyznačuje výskytem IgM specifických protilátek. IgM titry se objevují kolem 10 dne od infekce. Ve stejné době se objevují i symptomy onemocnění. IgG titry se vyskytují až několik dní později a přetrvávají celoživotně. Strukturální proteiny viru se využívají k detekci protilátek.

Nedávno byl nestrukturální protein NS-1 popsán jako sérologický marker u chronického průběhu nemoci. Nicméně u 10–20% všech sér jsou protilátky k tomuto proteinu nalezeny i po skončení infekce. U pacientů s podezřením na perzistující infekci (chronické anémie, chronické artopatie...) by měla proběhnout přímá detekce viru metodou PCR.

RecomLine Parvovirus B19 IgG (avidita), IgM

Tento test využívá antigeny Parvoviru B19, které byly vytvořeny pomocí genetického inženýrství. Jsou produkovány *E.coli* ve formě nefuzních proteinů.

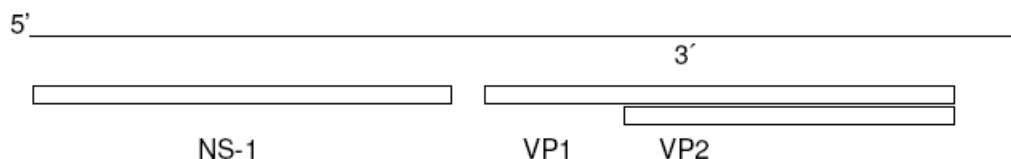
Sérologická interpretace založená na rozdělení strukturálního proteinu VP-1 na 2 segmenty a samostatné prezentaci lineárních a konformačních epitopů, umožňuje odhalit možnou fázi infekce. Obecně lze říci, že IgG

protilátky proti lineárním epitopům na celkovém strukturálním proteinu jsou produkovány při nástupu imunitní odpovědi hned po primární infekci. To znamená, že protilátky obsažené ve vzorku rozpoznávají jak N- tak C-terminální region (VP-N a VP-C, stejně jako VP-2r a VP-1S). V průběhu asi 6-9 měsíců jsou VP-C-specifické protilátky namířené proti lineárním epitopům nahrazeny protilátkami, které rozpoznávají konformační epitopy, které představuje protein VP-2p. Odpovídající IgG protilátky obvykle přetrvávají po celý život. S prodlužující se primární infekcí lze pozorovat klesající reaktivitu k VP-C (obvykle po 6 měsících) a VP-2r (po několika letech), zatímco IgG protilátky proti VP-N (a částečně také proti VP-1S) zůstávají detekovatelné po mnoho let. Protilátky proti VP-2p přetrvávají ve většině případů po celý život.

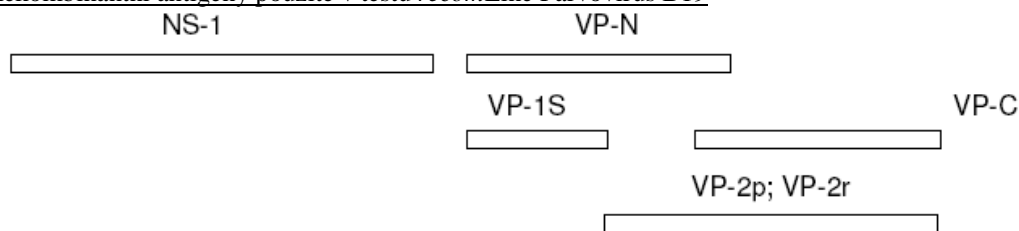
Na testovacím proužku je umístěn i nestrukturální protein NS-1. Podle literatury i našich vlastních zjištění, lze IgG protilátky proti NS-1 najít u pacientů s Parvovirem B19 indukovanou artritidou a dalšími chronickými formami onemocnění, ale nelze je najít u pacientů s akutní infekcí. Diagnózu nelze stanovit pouze na základě zjištění protilátek proti NS-1. Vždy musí být potvrzena pozitivním PCR výsledkem. Při podezření na perzistentní infekci Parvovirem B19, je přítomnost protilátek proti NS-1 považována za indikaci onemocnění.

Obr.1: Genová skladba Parvoviru B19; použití rekombinantních antigenů v *recomLine* Parvovirus B19 IgG, IgM

Lokalizace a uspořádání proteinů Parvoviru B19



Rekombinantní antigeny použité v testu *recomLine* Parvovirus B19



Tab.1.: Popis a diagnostický význam použitých rekombinantních antigenů

Rekombinantní antigen	Popis a diagnostický význam
VP-2 (VP-2p, VP-2r)	Hlavní kapsidový antigen; IgG protilátky proti konformačnímu epitopu (VP-2p) jsou většinou dlouhodobě detekovatelné, proti lineárnímu epitopu (VP-2r) jsou detekovatelné měsíce až několik let. Oba antigeny vykazují dobrou reaktivitu v časně fázi infekce (IgG a IgM). VP-2r IgG reaktivita odpovídá reaktivitě IgG protilátek proti VP-C.
VP-N	N-terminální fragment kapsidového antigenu VP-1; IgG protilátky zpravidla detekovatelné roky. Zahrnut do určování avidity protilátek.
VP-C	C-terminální fragment kapsidového antigenu VP-1, resp. VP-2; reaktivita IgG a IgM protilátek proti lineárním epitopům detekovatelná již v časných fázích infekce, pak mizí (IgG protilátky v období 8-26 týdnů (6 měsíců) negativní). IgM protilátky negativní většinou až do 12 týdne.
VP-1S	N-terminální, specifický fragment kapsidového antigenu VP-1 (tímto fragmentem se VP-1 liší od VP-2); IgG protilátky zůstávají detekovatelné dlouho po skončení infekce. Zahrnut do určování avidity protilátek.
NS-1	Nestrukturální protein 1; IgG protilátky proti tomuto proteinu se objevují nejdříve 6-8 týdnů po skončení infekce, minimálně u 20% nemocných. Protilátky mohou indikovat perzistenci viru.

Diagnostika infekce Parvovirem B19 může být usnadněna stanovením avidity IgG protilátek. IgG protilátky postupně vyzrávají a během tohoto procesu se zvyšuje jejich avidita (vaznost), protilátky s nejnižší aviditou jsou tedy v časně fázi infekce a nejvyšší aviditu pak mají post-infekční protilátky. Nízce aviditní protilátky lze z testovacího proužku odstranit pomocí avidity reagentu, zatímco vysoce aviditní protilátky toto reagens odstranit nemůže. Porovnáním dvou paralelně provedených IgG proužků (jeden ošetřen avidity reagentem) lze stanovit aviditu protilátek a tím i fázi infekce. Avidity reagens k dispozici na vyžádání.

- Imunodominantní rekombinantní antigeny VP-1 a VP-2.
- Oddělená detekce IgG a IgM protilátek.
- Snadné hodnocení testu díky specifickým kontrolám (cut-off a kontrola reakce konjugátu).
- Dobře definované a vysoce purifikované rekombinantní antigeny, navíc s vysokou specifitou; jednoduše a jasně interpretovatelné.
- Vysoká citlivost díky kvantitativně optimalizovaným antigenům.
- Snadné a spolehlivé určení avidity protilátek.

4. PRINCIP TESTU

Na nitrocelulóзовou membránu jsou aplikovány rekombinantní, vysoce purifikované proteiny. Matrix je poté rozstřihána na jednotlivé proužky.

Při diagnostice Parvovirus B19 specifických protilátek jsou proužky nejprve inkubovány se zředěným vzorkem séra nebo plazmy. Během inkubace se specifické protilátky váží k odpovídajícím antigenům. 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 pomocí peroxidázou katalyzované barevné reakce. Došlo-li k reakci antigen-protilátka, objeví se na odpovídajícím místě membrány proužku tmavý band.

Na horním konci testovacího proužku jsou vedle sebe postupně seřazeny následující kontrolní bandy:

1. kontrola reakce - umístěna těsně pod číslem proužku, tento band se musí objevit při každé reakci s jakýmkoli testovaným sérem
2. kontrolní bandy reakce konjugátu - IgG/IgM – slouží jako kontrola reakce odpovídající třídy protilátek. Je-li proužek použit např. k detekci IgG protilátek, objeví se u kontroly IgG konjugátu zřetelný band. Totéž platí pro IgM protilátky.
3. „cut-off“ kontrola – kontrolní band intenzity zbarvení, jeho intenzita zbarvení slouží zároveň jako základní kritérium pro stanovení reaktivity protilátek jako pozitivní, hraniční nebo negativní.

5. OBSAH SOUPRAVY

Každá souprava obsahuje uvedené reagensie v množství potřebném pro 20 vyšetření:

promývací pufr A (10x koncentrovaný): obsahuje fosfátový pufr, NaCl, KCl, detergent, MIT (0.1%) a Oxyprion (0.2%) jako konzervační látky	100 ml
substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin, k přímému použití)	40 ml
mléčný prášek	5 g
návod k použití	1 ks
vyhodnocovací formulář	1 ks
inkubační misky, každá s 10 žlábků	2 ks

5.1. RecomLINE PARVOVIRUS B19 IgG

Mimo reagensie uvedené v bodu 5 souprava obsahuje:

zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými rekombinantními antigeny Parvoviru B19	2 ks
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

Detekce avidity protilátek

Pro detekci avidity IgG protilátek proti Parvoviru B19 je k soupravě k dispozici na vyžádání Avidity reagens (pevné skupenství; pro přípravu 60 ml roztoku k přímému použití)

5.2. RecomLINE PARVOVIRUS B19 IgM

Mimo reagensie uvedené v bodu 5 souprava obsahuje:

zkumavka s číslovanými testovacími proužky (10 ks) potaženými rekombinantními antigeny Parvoviru B19	2 ks
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 REAGENCIE A VYBAVENÍ, KTERÉ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Deionizovaná voda, odsávací zařízení s dezinfekční nádobou, mikropipety, plastová pinzeta, třepačka, odměrné válce se stupnicí, váhy.

7. INFORMACE O TESTU A REAGENCIÍCH

7.1. Preventivní opatření

- ☞ Pracujte v ochranných rukavicích.
- ☞ Konjugát obsahuje azid sodný, MIT (Methylisothiazolone) a Chloracetamid. Vyvarujte se proto kontaktu s kůží a sliznicemi.
- ☞ Všechny reagensie a materiály, které přišly do styku s potenciálně infekčními vzorky, musí být dezinfikovány nebo nejméně 1 hodinu autoklávovány při 121°C.
- ☞ Inkubační misky nepoužívejte opakovaně.
- ☞ S testovacími proužky zacházejte opatrně pomocí plastové pinzety.

7.2. Skladování

- Reagensie skladujte při teplotě 2-8°C, **nezmrazujte**. Před provedením testu temperujte všechny komponenty soupravy minimálně 30 minut při 18-25°C (laboratorní teplota). Samotný test i inkubační procedury probíhají při laboratorní teplotě.
- Shodující se reagensie (dle tištěných symbolů) mohou být použity u různých imunoblotů odpovídající šarže. Dodržujte prosím dobu expirace jednotlivých komponent soupravy.

- Koncentráty obou konjugátů i séra pacientů před provedením testu dobře protřepejte.
- Zkumavku obsahující testovací proužky otevřete až těsně před použitím, aby nedocházelo ke kondenzaci vlhkosti uvnitř zkumavky. Nepoužité proužky musí být skladovány ve zkumavce při 2-8°C. Zkumavku pevně uzavřete, proužky nesmí před provedením testu navlhnout!
- Jednotlivé proužky jsou vzestupně očíslovány a označeny zkratkou daného testu.
- Po uplynutí doby expirace uvedené na obalu soupravy nelze zaručit kvalitu výsledků.
- Chraňte všechny komponenty soupravy 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

Je používán při ředění séra a konjugátu a při promývání.

Před jeho zředěním je nutné určit objem potřebný pro daný počet prováděných testů. Nejprve rozpustěte mléčný prášek v koncentrátu promývacího pufru A. Tuto směs poté doplňte deionizovanou vodou na konečný objem (ředění 1+9). Potřebné objemy jednotlivých reagensů udává tabulka 2. 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: Promývací pufr A potřebný pro daný počet testovacích proužků

Použité proužky	Mléčný prášek	Koncentrovaný promývací pufr 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
25	2.5 g	50 ml	450 ml	500 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 resp. IgM konjugátu

Použité proužky *	Koncentrovaný IgG/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
25	500 µl	50 ml

* Objemy jsou počítány bez „mrtvého objemu“. Připravujte proto roztok konjugátu pro 1-3 proužky navíc v závislosti na způsobu zpracování 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

Reagensie 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. 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 recomLine Parvovirus B19 IgG/IgM. 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 žlábk je určen pro 1 testované sérum. Do každého žlábk napipetujte **2 ml** pracovního ředění promývacího pufru A. Plastovou pinzetou opatrně ponořte testovací proužek do příslušného žlábk naplněného promývacím pufrem. Číslo proužku musí směřovat vzhůru.

Upozornění!

Testovací proužek musí být do promývacího pufru A zcela ponořen.

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

2. Přidání vzorků

IgG/IgM test: Do příslušných žlábk 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 nebo 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 žlábk 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 žlábk přidejte **2 ml** připraveného **roztoku konjugátu** (viz tabulka 3). Za jemného třepání při laboratorní teplotě **45 minut** inkubujte. Během inkubace musí být žlábk zakryty plastovým víčkem.

9.5. Promytí

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

9.6. Reakce substrátu

1. Do každého žlábk přidejte **1.5 ml roztoku substrátu** a za jemného třepání inkubujte při laboratorní teplotě **5-10 minut**.
2. Cut-off kontrolní band musí vykazovat slabé, ale jasně zřetelné zbarvení.

9.7. Zastavení reakce

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

9.8. Pracovní postup při určování avidity protilátek

Postup je detailně popsán v instrukcích pro 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.
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 5–10 minut.
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

- Do přiložené vyhodnocovací tabulky запиšte datum, šarži, číslo zkumavky a detekovanou podtřídou protilátek.
- Dále запиšte identifikační čísla vzorků.
- 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.
- Podle kontrolního proužku vytištěného na vyhodnocovacím protokolu pro každou třídu imunoglobulinů zvlášť určete u jednotlivých bandů intenzitu reakce (tabulka 4). Výsledek запиšte do protokolu.

11.2. Kontrola výsledků

Výsledky testu lze hodnotit, pouze pokud jsou splněna následující kritéria:

- band kontroly reakce (nejbližší band pod číslem proužku) musí být zřetelně zbarvený
- třída protilátek (druhý a třetí band): kontrolní band odpovídající třídy protilátek musí být viditelný, jasně zbarvený proužek (intenzita silnější než cut-off bandu); druhý kontrolní band protilátek může vykazovat slabé, nespecifické zbarvení
- cut-off kontrola (čtvrtý band) – slabé, ale zřetelně viditelné zbarvení

Tab. 4: Intenzita bandů v porovnání s intenzitou zbarvení cut-off bandu

Proužky	Intenzita
žádná reaktivita	-
intenzita slabší než u cut-off bandu	±
stejná intenzita jako u cut-off bandu	+
silná intenzita (silnější než u cut-off bandu)	++
velmi intenzivní zbarvení	+++

Upozornění!

Při detekci IgG a IgM protilátek mohou vzorové bandy vykazovat různou intenzitu zbarvení. Intenzita jednotlivých bandů závisí na koncentraci Parvovirus B19-specifických protilátek, je tedy možné, že v IgG testu (v porovnání s IgM testem) budou mít bandy tmavší, intenzivnější zbarvení.

Vyhodnocení avidity protilátek: viz kapitulu 11.5.

11.3. Výsledky a interpretace testu

Tab. 5: Vyhodnocení IgG testu (vyjma stanovení reaktivity bandu NS-1)

Žádná reakce nebo jiná schémata, než jsou uvedena níže		IgG negativní
VP-N nebo VP-2r nebo VP-C pozitivní	Při nejmenším +	IgG hraniční
VP-2p nebo 2 antigeny (VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C) pozitivní	Při nejmenším +	IgG pozitivní

Tab. 6: Vyhodnocení IgM testu (vyjma stanovení reaktivity bandu NS-1)

Žádná reakce nebo jiná schémata, než jsou uvedena níže		IgM negativní
VP-N nebo VP-1S nebo VP-2r nebo VP-C pozitivní	Při nejmenším +	IgM hraniční
2 antigeny (VP-N, VP-1S, VP-2p, VP-2r, VP-C) pozitivní	Při nejmenším +	IgM pozitivní

Vyhodnocení reaktivity NS-1 bandu (IgG)

Reaktivita NS bandu musí být posuzována ve vztahu k IgG protilátkám. Za normálních podmínek nemusí být protilátková odpověď na NS band hodnocena.

Slouží k určování přibližné doby vzniku infekce. Pozitivně reagující anti-NS-1 IgG protilátky poukazují na infekci starší než 6 týdnů. Musí však být brán zřetel na to, že protilátky proti NS-1 jsou tvořeny jen zhruba u 20% případů.

V souvislosti s případnými symptomy a předběžnými klinickými nálezy, NS-1 titr může indikovat možnou perzistenci viru.

Nicméně, diagnóza „perzistentní Parvovirus B19 infekce“ nemůže být nikdy určena pouze na základě sérologických výsledků. Sérologická vyšetření musí být podložena izolací antigenu nebo virové DNA. Musí být rovněž bráno v úvahu to, že IgG protilátky proti NS-1 se tvoří pouze v určitém časovém intervalu, výsledek PCR tedy nemusí být v každém stadiu infekce pozitivní. Z tohoto důvodu musí být testy prováděny v určitých intervalech v průběhu trvání infekce.

11.4. Instrukce pro interpretaci výsledků testu

Při hodnocení výsledků testu je nutné posuzovat výsledky IgG i IgM testu dohromady.

Při interpretaci výsledku, zvláště u testů se slabě pozitivním výsledkem, je velmi důležité brát v úvahu klinické projevy daného pacienta. K určení správné léčby onemocnění je tedy vyžadována úzká spolupráce laboratoře s klinikem. Vzorky s nejasnými nebo hraničními výsledky musí být po 2-3 týdnech testovány znovu s ohledem na klinický obraz pacienta.

Negativní výsledek testu nemůže vyloučit možnou infekci Parvovirem B19. Falešně negativní výsledky se mohou objevit, byly-li vzorky séra odebrány velmi brzy po infikaci organismu, kdy ještě nejsou vytvořeny specifické protilátky.

Pozitivní výsledky IgM testů (samostatné, bez IgG protilátek) musí být interpretovány obezřetně, může jít o akutní infekci v časném stadiu infekce.

Slabá reaktivita IgM protilátek může být způsobena perzistujícími IgM protilátkami, které se vytvořily při dříve prodělané infekci. Dále reaktivovanými IgM protilátkami (např. prodělává-li pacient EBV infekci) nebo nespecificky reagujícími protilátkami.

Ikterická séra by neměla být použita, vedou k falešným výsledkům.

Typické profily reakce:

Na základě vyhodnocení, které byly dosud provedeny, mohou následující zákonitosti reaktivity IgG/IgM protilátek pomoci objasnit aktuální status infekce. Je však nutné mít na paměti, že toto jsou typické zákonitosti reakce protilátek, různé odchylky jsou tedy dost dobře možné.

Reaktivita IgG protilátek proti VP-2p a/nebo VP-N (obvykle i s VP-1S) je obvykle pozorována při déletrvajícím infekce.

V případě akutní infekce je pozorována výrazná reaktivita IgG protilátek nejen proti VP-C a VP-2r, ale navíc i proti VP-2p, VP-N a VP-1S. Výrazná reaktivita protilátek vůči VP-C je charakteristická pro počáteční fáze infekce (doba trvání infekce není delší než 6 měsíců) nebo pro infekce, které byly prodělané v minulosti. V ojedinělých případech je pozorována velmi silná reaktivita IgG protilátek proti VP-2r, přičemž reaktivita IgG protilátek vůči VP-C je velmi slabá nebo vůbec žádná – jedná se o časně stadium infekce. V tomto případě bude titr VP-C IgG protilátek stále vzrůstat.

Tab. 7: Parvovirus B19 status - typické zákonitosti reakce IgG/IgM protilátek

IgG	IgM	Pravděpodobný status infekce
VP-2p, VP-N, VP-2r, VP-C (reaktivita většinou $\leq +$)	VP-2p, VP-N (reaktivita většinou $\geq ++$) VP-2r, VP-C (reaktivita většinou $a \geq ++$)	Akutní infekce Titr IgG protilátek je velmi nízký nebo chybí úplně
VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r, VP-C (reaktivita většinou $\geq ++$)	VP-2p, VP-N a VP-2r (reaktivita většinou $\geq +$)	Pozdní infekce (týden až měsíc) s IgM i IgG odpovědí
VP-2p, VP-N, VP-2r a VP-C, obvykle i VP-1S (reaktivita většinou $\geq ++$)	Negativní nebo hraniční (ojedinělá reaktivita protilátek $\leq +$)	Pozdní infekce (měsíc)
VP-2p a/nebo VP-N s VP-1S (reaktivita většinou $\geq +$) VP-2r a VP-C negativní	Negativní	Dlouhotrvající infekce (roky)
VP-2p, VP-N a VP-2r, (reaktivita většinou jen $+$)	VP-2p, VP-N a/nebo VP-2r (případně i VP-1S); (reaktivita většinou jen $+$)	Nejasný status, test by měl být po určité době zopakován
VP-2p, VP-N, VP-1S (reaktivita většinou $\geq +$) VP-2r a VP-C negativní	VP-N, VP-1S (reaktivita většinou jen $+$)	Pozdní infekce s IgG odpovědí a atypickou reaktivitou IgM protilátek, tento status byl popsán u vzorků s pozitivním RF; test by měl být po určité době zopakován

Odpověď IgG protilátek musí být vždy interpretována v souladu s odpovědí IgM protilátek (pozitivní nebo hraniční). U některých pacientů koncentrace IgM protilátek může velmi rychle klesat, zvláště těch, které jsou namířeny proti lineárním epitopům. To je i důvod, proč je pozitivní odpověď IgM protilátek pozorována i 4 týdny po infikaci organismu.

V tab. 7 nebyl hodnocen titr NS-1 protilátek pro objasnění dlouhotrvající infekce Parvovirem B19, reaktivní arthropatie, chronické anémie nebo jiných symptomů s očekávanou perzistencí Parvoviru B19. A to z toho důvodu, že zde existuje velké množství možných kombinací v závislosti na době trvání infekce, klinických datech a imunokompetenci. NS-1 titr by měl být do interpretace zahrnut pouze, je-li třeba odpovědět na specifické otázky (viz. 11.3).

Testování avidity protilátek:

Určení avidity IgG protilátek proti individuálním antigenům umožňuje ve většině případů přesněji definovat aktuální status infekce, a částečně také usnadní rozlišení akutní infekce Parvovirem B19 od subakutní infekce s perzistujícími IgM protilátkami (viz 11.5.).

Tmavě zbarvené testovací proužky:

Séra některých pacientů (např. s alergií na mléčné proteiny) mohou vytvářet tmavě zbarvení celého nitroceluló-zového 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.

11.5. Rozšiřující vyšetření – určení avidity protilátek

11.5.1. Princip a postup testu

Postup testu pro stanovení avidity protilátek je detailně popsán v návodu na použití avidity reagentu. Dodržujte prosím instrukce popsané v tomto návodu.

11.5.2. Avidita IgG protilátek proti Parvoviru B19

RecomLine Parvovirus B19 detekuje reaktivitu protilátek proti jednotlivým antigenům, VP-N a VP-1S. Avidita protilátek proti VP-2r a VP-C antigenům není určována, protože tyto vysoce aviditní protilátky nejsou v mnoha případech v průběhu infekce tvořeny. Strukturální epitopy VP-2 antigenů byly avidity reagentem modifikovány, určování avidity tohoto antigenů proto není spolehlivé.

11.5.3. Interpretace výsledků stanovení avidity protilátek

- Hodnotí se pouze avidita pozitivních IgG protilátek.
- Hodnotí se pouze avidita IgG protilátek proti VP-N a VP-1S.
- Nelze brát v úvahu reaktivitu IgG protilátek nižší než je u cut-off kontroly (velmi slabá intenzita zbarvení).
- Srovnajte intenzitu zbarvení odpovídajících bandů u dvou proužků inkubovaných se stejným vzorkem testovaného séra (IgG proužek a avidity proužek). Ověřte, zda se intenzita zbarvení změnila.
- Při nízké aviditě protilátek se intenzita bandů snižuje minimálně o 50%, při střední aviditě protilátek se intenzita bandů snižuje o cca 50%.
- U vysoce aviditních protilátek se intenzita bandů na proužku avidity nesnižuje vůbec nebo jen velmi málo.
- IgG protilátky proti VP-N a VP-1S vykazují vysokou aviditu jak v časném stadiu infekce (4 týdny od infekce), tak v pozdní fázi (6-8 týdnů). Nízkou, respektive střední aviditu protilátek proti VP-N a VP-1S lze tedy interpretovat jako akutní infekci. Přítomnost vysoce aviditních IgG protilátek proti VP-N a VP-1S obvykle vylučuje infekci organismu v minulých 4 týdnech. Pokud se avidita IgG protilátek proti VP-N liší od avidity IgG protilátek proti VP-1S, je rozhodující avidita proti VP-1S.
- Obecně lze říci, že určování avidity protilátek nelze přikládat absolutní význam. V jednotlivých případech je nutno mít na paměti to, že nízké aviditní protilátky se mohou tvořit i v pozdní fázi infekce (díky opožděnému vyžívání protilátek). Avidita protilátek musí proto být interpretována v kontextu se všemi zjištěnými výsledky (viz 12.7.).

12. KLINICKÉ VÝSLEDKY

Pro určení kapacity provedení testu recomLine Parvovirus B19 IgG (avidita), IgM byly testovány vzorky získané z různých zdrojů. Celkem bylo provedeno 298 IgG a 287 IgM testů. Navíc bylo testováno 70 potenciálně chybných vzorků a provedeno 10 srovnání sérum-plazma. Pro určení avidity IgG protilátek bylo testováno 125 vzorků sér.

12.1. Vzorky, u kterých byla prokázána akutní Parvovirus B19 infekce

Bylo testováno 52 vzorků pacientů infikovaných Parvovirem B19. Panel zahrnoval vzorky z 12 stadií infekce (2-5 vzorků od každého pacienta). Ve všech 12 stadiích byly prokázány specifické Parvovirus B19 protilátky. V některých případech byl pozitivní první vzorek k určení fáze infekce. U pacientů, kde byl první vzorek negativní, byla u dalších vzorků prokázána sérokonverze. IgM protilátky byly detekovatelné v 11ti z dvanácti fází infekce, nejméně do 42 dne od prvních projevených příznaků. Ve všech 12ti fázích byly minimálně u 1 séra odpovídající fáze detekovány IgG protilátky proti VP-C.

12.2. Dárci krve

Bylo testováno 187 (IgG) a 176 (IgM) vzorků plazmy od náhodně vybraných dárců krve. Vzorky byly potvrzovány pomocí ELISA testu (viz 12.3.2.).

Výsledky IgG testu: u 66% vzorků pacientů byly prokázány IgG protilátky, většina těchto pozitivních vzorků vykazovala zákonitost typické pro pozdní fázi infekce (viz tab. 8).

Výsledky IgM testu: u 3% vzorků pacientů byly prokázány IgM protilátky.

Reaktivity IgG protilátek u 100 dárců krve jsou uvedeny v následující tabulce:

Tab. 8: Reaktivita IgG protilátek

Dárci krve n = 100		Reaktivita IgG protilátek - pozitivní výsledek v <i>recomLine</i> Parvovirus B19							
výsledky	%	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	n	%
negativní	31	-	-	-	-	-	-	-	--
pozitivní	69	+	-	-	-	-	-	7/69	10
		+	+	-	-	-	-	3/69	4.3
		+	+	+	-	-	-	28/69	41
		+	+	+	+	-	-	25/69	36
		+	+	+	+	+	-	6/69	8.7

12.3. Srovnání ELISA testu a *recomLine* Parvovirus B19

Shoda mezi těmito 2 metodami byla u IgG protilátek 98%, u IgM protilátek pak v rozmezí 93.1-95.5% u různých souborů pacientů. Při vyhodnocování „shody těchto 2 metod“ byly hraniční výsledky stanoveny za pozitivní.

12.3.1. Výsledky 101 vzorků sér pacientů s akutní nebo nedávnou Parvovirus B19 infekcí

Akutní nebo nedávná infekce		ELISA Parvovirus B19 IgG/IgM		
recomLine Parvovirus B19 IgG	pozitivní	99	0	0
	hraniční	0	0	1
	negativní	1	0	0

recomLine Parvovirus B19 IgM	pozitivní	40	0	1
	hraniční	2	1	4
	negativní	1	1	51

Celkem IgG resp. IgM = 101

Shoda v IgG třídě = 98.0 %

Shoda v IgM třídě = 93.1 %

12.3.2. Dárci krve

Dárci krve		ELISA Parvovirus B19 IgG/IgM		
recomLine Parvovirus B19 IgG	pozitivní	123	0	1
	hraniční	0	0	0
	negativní	2	1	60

recomLine Parvovirus B19 IgM	pozitivní	2	2	2
	hraniční	0	0	3
	negativní	3	0	164

Celkem IgG = 187

Celkem IgM = 176

Shoda v IgG třídě = 97.8 %

Shoda v IgM třídě = 95.5 %

12.4. Určení citlivosti WHO IgG standardu

IgG WHO standard (100 IU/ml) byl testován soupravami *recomLine* Parvovirus B19 IgG a ELISA IgG v ředěních odvozených od daného standardu. IgG WHO standard stále ukazoval hraniční výsledky (osamocená pozitivní reaktivita vůči VP-N) u ředění 1.5 IU/ml jak *recomLine* Parvovirus B19, tak i ELISA testem.

12.5. Vzorky s potenciálně falešným výsledkem

Byly testovány vzorky sér s potenciálně interferenčními faktory (lipemické, CRP-pozitivní nebo ANA-pozitivní vzorky sér).

Hemolytické nebo ikterická séra či séra pacientů s pozitivním revmatoidním faktorem vykazovala mírně zvýšené výsledky IgM testu. V případě probíhající infekční mononukleózy (Pfeifferova choroba, EBV infekce) může docházet k polyklonální stimulaci B-lymfocytů. To má za následek pozitivní výsledky v IgM testu.

12.6. Porovnání vzorků sér a plazmy

Porovnáním 10 vzorků nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi sérem a plazmou.

12.7. Vyhodnocení avidity protilátek






RecomLine Parvovirus B19 IgG bylo na aviditu IgG protilátek proti VP-N a VP-1S testováno 67 vzorků sér odebraných v akutní, nedávné i pozdní fázi infekce. Zjištěné výsledky korelovaly s klinickými daty a reaktivita protilátek proti jednotlivým antigenům pak se zjištěnou hladinou IgG a IgM protilátek. Dle získaných výsledků je zřejmé, že IgG protilátky proti VP-N a VP-1S dosahovaly ve většině případů nejvyšší avidity v 6-8 týdnu, u některých již po 4 týdnech od infekce organismu.

Navíc bylo testováno 58 vybraných IgG pozitivních dárců krve. Všechny vzorky prokazovaly schéma protilátek typické pro pozdní fázi infekce, respektive již „poinfekční status (měsíce)“. U 10 vzorků byla avidita protilátek hraniční (10%) a u 1 vzorku nízká (1.7%). IgM protilátky byly u těchto vzorků negativní.

13. LITERATURA

- 1) S. Modrow, S. Dorsch: Antibody responses in parvovirus B19 infected patients. *Pathol Biol* (2002), 50, 326 – 31.
- (2) H. W. Lehmann, S. Modrow: Parvovirus B19. *Monatsschr Kinderheilkd* (2004), 152, 203 – 214.
- (3) P. Cassinotti: Human Parvovirus B19 infections and their diagnosis. *Alpe Adria Microbiology Journal* (1995), 4, 235 – 246.
- (4) S. Modrow: Parvovirus-B19. *Deutsches Ärzteblatt* 98, Heft 24, (2001), A1620 - A1624.
- (5) M. Schleunig: Parvovirus-B19-Infektionen. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 43, (Oktober 1996), B2182 - B2185.
- (6) M. Söderlund, C. S. Brown, W. J. M. Spaan, L. Hedman, K. Hedman: Epitope type-specific IgG response to capsid proteins VP1 and VP2 of human Parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases* 172, (1995), 1431 – 1436.
- (7) T. F. Schwarz, G. Jäger: A recombinant immunoblot and ELISA for detection of acute Parvovirus B19 infection. *Zbl. Bakt.* 280, (1994), 526-533.
- (8) A. von Poblitzki, A. Gigler, B. Lang, H. Wolf, S. Modrow: Antibodies to Parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J. Gen.Virology* (1995), 76, 519-527.
- (9) A. von Poblitzki, A. Hemnauer, A. Gigler, E. Puchhammer-Stöckl, F.-X. Heinz, J. Pont, K. Laczika, H. Wolf, S. Modrow: Antibodies to the nonstructural protein of Parvovirus B19 in persistently infected patients: Implications for pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases* (1995), 172, 1356-1359.
- (10) K.-I. Pfepper, M. Enders, M. Motz: Human Parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *Journal of Veterinary Medicine Series B* (2005), 52, 362-365.

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