

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANA TOMC

**DOKAZOVANJE PROTITELES PROTI PARVOVIRUSU B19
Z METODO KEMILUMINISCENCE**

**DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST PARVOVIRUS
B19 BY KEMILUMINISCENCE METHOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Miroslavu Petrovcu, ki mi je omogočil izvedbo diplomske naloge. Zahvaljujem se delavcem v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, zlasti gospe Tanji, ki mi je pomagala pri izvedbi praktičnega dela. Zahvala gre tudi mojim staršem, bratu in prijateljem, ki so mi pomagali, me podpirali in spodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Miroslava Petrovca.

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD.....	1
1.1 PARVOVIRUS B19	1
1.2 ZGRADBA	2
1.3 EPIDEMIOLOGIJA	3
1.4 NASTANEK IN RAZVOJ BOLEZNI	3
1.5 KLINIČNA SLIKA	4
1.6 PETA BOLEZEN – IZPUŠČAJ	4
1.7 BOLEČINE IN VNETJA V SKLEPIH (ARTRITIS)	5
1.8 PRIZADETOST KRVI IN KOSTNEGA MOZGA	5
1.9 OKUŽBE PLODA	6
1.10 DRUGI KLINIČNI POJAVI	8
1.11 PREPREČEVANJE	8
1.12 ZDRAVLJENJE	8
1.13 DIAGNOSTIKA	9
1.13.1 ENCIMSKO IMUNSKI TEST (ELISA)	11
1.13.2 METODA KEMILUMINISCENCE (CLIA)	11
1.13.3 METODA IMUNOBLOT	13
2 NAMEN	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 VZORCI	16
3.2 METODE	16
3.2.1 BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgG ELISA (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)	17
3.2.2 BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgM ELISA (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)	19
3.2.3 LIAISON BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgG (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)	21
3.2.4 LIAISON BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgM (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)	22
3.2.5 RECOMLINE PARVOVIRUS B19 IgG [AVIDNOST] / IgM (Mikrogen diagnostik, Neuried, Nemčija)	23
3.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	25
4 REZULTATI	27
4.1 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES IgG	27
4.2 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES IgM	28
4.3 NESKLADNI REZULTATI	29
4.4 REZULTATI TESTA IMUNOBLOT	30
4.5 KONČNI REZULTATI	31
4.6 IZRAČUN OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI TESTOV	33
4.6.1 Biotrin ELISA IgG	33
4.6.2 Metoda kemiluminiscence Liaison Biotrin IgG	33
4.6.3 Biotrin ELISA IgM	34
4.6.4 Metoda kemiluminiscence Liaison Biotrin IgM	34
5 RAZPRAVA	35
6 SKLEP	38

7 LITERATURA	39
PRILOGE	41

POVZETEK

Parvovirus B19 najpogosteje povzroča peto bolezen ali *erythema infectiosum* pri otrocih, okvare ali smrt ploda ter artralgije, artritise, prehodno aplastično krizo ali kronično anemijo pri odraslih. Specifičnega zdravila proti virusu ni, zdravljenje je simptomatsko.

Diagnostika okužb s parvovirusom B19 je precej zapletena, kljub temu pa mora biti natančna in pravočasna.

V diplomski nalogi smo primerjali nov diagnostični komplet proizvajalca DiaSorin, Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG in IgM, ki temelji na metodi kemiluminiscence, z encimsko imunsko metodo Biotrin. Test Biotrin ELISA se izvaja ročno, rezultate pa odčitavamo s polavtomatskim procesorjem. Metoda kemiluminiscence se v celoti izvaja na analizatorju Liaison in je zato hitrejša, enostavnejša ter cenejša.

Z obema metodama smo pregledali 251 serumskih vzorcev, odvzetih v letu 2009. Vzorce smo anonimizirali. Pripadali so pacientom različnega spola in starosti. Vsi so bili poslani v redno diagnostiko s sumom na okužbo s parvovirusom B19. Rezultate obeh metod smo primerjali, kot potrditveni test smo uporabili metodo imunoblot.

Pri testiranju za specifična protitelesa IgG smo ugotovili 98 % ujemanje med metodama, 100 % občutljivost in 96 % specifičnost metode Biotrin ELISA ter 98,8 % občutljivost in 100 % specifičnost metode Liaison Biotrin. Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM smo ugotovili 98 % ujemanje rezultatov, 93 % občutljivost in 100 % specifičnost metode Biotrin ELISA ter 100 % občutljivost in 98,2 % specifičnost metode Liaison Biotrin.

Vzorce z neskladnimi rezultati smo testirali z *recomLine* imunoblot testom. Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG smo ugotovili 2 lažno negativna rezultata metode Liaison Biotrin ter 3 lažno pozitivne rezultate metode Biotrin ELISA. Pri testiranju za specifična protitelesa IgM smo dobili 4 lažno pozitivne rezultate z metodo Liaison Biotrin in 1 lažno negativnen rezultat z metodo Biotrin ELISA. Tudi proizvajalci obeh testov so prišli do podobnih rezultatov, ko so primerjali testa med seboj. Obe metodi sta natančni in zanesljivi za diagnostiko okužb s parvovirusom B19, zato bi nov diagnostični komplet Liaison Biotrin lahko zamenjal že obstoječo metodo Biotrin ELISA.

ABSTRACT

Parvovirus B19 most often causes fifth disease or *erythema infectiosum* in children, defects or fetal death, arthralgia, arthritis, aplastic crisis or chronic anemia in adults. There is no specific anti-virus medicines and treatment is only symptomatic. Althought, the diagnostic of parvovirus B19 infections are very complex, it must be accurate and timely.

We compared the new diagnostic kit of the manufacturer DiaSorin, Liaison Biotrin parvovirus B19 IgG and IgM, which is based on the method of chemiluminescence with Biotrin enzyme immuno method. The Biotrin ELISA is carried out manually, the results are read with semi-automatic processor. Chemiluminescence method is fully performed on the Liaison analyzer and therefore quicker, easier and cheaper.

We examined 251 serum samples taken in 2009 by both methods. Patients were anonymous, different sex and age. They were all sent to the regular diagnosis with suspicion of infection with B19 parvovirus. The results of both methods were compared. We used immunoblot method as the confirmatory test.

We found 98 % correlation between the two methods, 100 % sensitivity and 96 % specificity of Biotrin ELISA method, and 98.8 % sensitivity and 100 % specificity of Liaison Biotrin method in testing for specific IgG antibodies. In determination of specific IgM antibodies, we found 98 % agreement in two methods, 93 % sensitivity and 100 % specificity of the Biotrin ELISA method and 100 % sensitivity and 98,2 % specificity of Liaison Biotrin method.

Samples with discrepant results were tested by recomLine immunoblot assay. We found two false-negative results of the Liaison Biotrin method, and 3 false-positive results of the Biotrin ELISA method in determination of specific IgG antibodies. There were 4 false-positive results obtained with the Liaison Biotrin method and 1 false-negative result by Biotrin ELISA method in testing for specific IgM antibodies.

When comparing tests, the manufacturer of both methods also found similar results. Both methods are accurate and reliable for the diagnosis of parvovirus B19 infection. Also the new diagnostic kit Liaison Biotrin could replace existing Biotrin ELISA in the laboratory for the diagnosis of viral infections.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA:	deoksiribonukleinska kislina
NS1:	strukturni protein
VP1:	virusni protein 1
VP2:	virusni protein 2
kDa:	kilodalton; enota za izražanje atomske teže
IgG:	imunoglobulin razreda G oz. primarni humani globulin gama
IgM:	imunoglobulin razreda M
S faza mitoze:	faza, v kateri se pomnožuje dedni material
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay (encimsko imunski test)
CLIA:	chemiluminescence immunoassay (imunska metoda s kemiluminiscenco)
N-terminalen:	NH_3^+ konec
C-terminalen:	CO_2^- konec
T:	temperatura
EDTA:	etilendiamintetraocetna kislina
TMB:	tetrametilbenzidin
COV:	cut-off value oz. mejna vrednost kontrole
FDA:	US Food and Drug Administration

1 UVOD

1.1 PARVOVIRUS B19

Parvovirus B19 spada v družino *Parvoviridae*, poddružino *Chordoparvovirinae*, rod *Erythrovirus*.

Najpogosteje povzroča peto bolezen ali *erythema infectiosum* pri otrocih, artralgije in artritise pri odraslih, prehodno aplastično krizo pri bolnikih s kronično hemolitično anemijo, kronično anemijo pri bolnikih z motnjami v imunskega odziva in različne okvare ali smrt ploda.

Tabela I: Bolezni, ki jih povzroča parvovirus B19 (4).

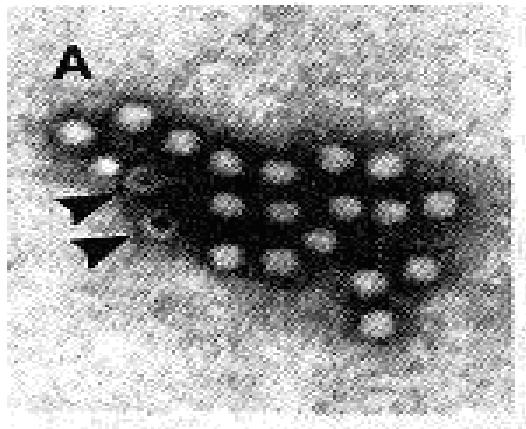
Bolezen	Potek	Gostitelj
Peta bolezen	Akuten	Otroci
Artritis/artralgija	Akuten/kroničen	Odrasli
Prehodna aplastična kriza	Akuten	Bolniki s povečano eritropoezo
Hidrops fetalis/prirojena anemija	Akuten/kroničen	Plod
Trajna anemija	Kroničen	Bolniki z motenim imunskim odzivom

Parvovirus B19 je leta 1975 odkrila avstralska virologinja Yvonne Cossart. Opazila je nenavadno reakcijo v serumu zdravega darovalca krvi, pri testiranju za hepatitis B.

John Pattison je leta 1981 našel specifična protitelesa v serumih otrok, ki so imeli hude komplikacije pri bolezni srpastih celic. Tako je povezel parvovirusno okužbo z boleznijo prehodne aplastične krize (1).

1.2 ZGRADBA

Parvovirus B19 je majhen virus, velik od 18 do 25 nm. Je ikozahederalne oblike in nima ovojnice (slika 1).



Slika 1: Elektronska mikroskopija - simertični, ikozahederalni, 25nm veliki delci, s prazno kapsido v serumu okužene osebe (1).

Genom je negativno polarna linearna enovijačna deoksiribonukleinska kislina (DNA), sestavljena iz 5500 nukleotidov. Virus sestavlja trije virusni proteini. Nestruktturni protein (NS1), ki ga kodira 5' konec genoma. Struktura proteina, virusni protein 1 (VP1) in virusni protein 2 (VP2), ki sestavlja kapsido in ju kodira 3' konec genoma.

Struktturni protein VP1 je velik 84kDa in sestavlja 5 % kapside. Ostalih 95 % sestavlja drugi struktturni protein VP2, ki je velik 58kDa. VP1 se od VP2 razlikuje le po dodatnih 226 aminokislinah na N-terminalni regiji. Ima pa fosfolipazno aktivnost in pomembno vlogo pri nevtralizaciji protiteles, saj so dodatne aminokisline večinoma na zunanjih strani viriona.

Nestruktturni protein NS1, je fosfoprotein, velik 78 kDa (2). Ima pomembne funkcije pri transkripciji, replikaciji virusa in smrti gostiteljske celice. Prav tako ima tudi ATPazne, helikazne in endonukleazne aktivnosti (3).

Parvovirus B19 ima na površju kapside α -spiralne zanke, ki jih imunski sistem gostitelja prepozna kot antigenske determinante (1).

Virus je razmeroma odporen na toploto, pH okolja in eter. Deaktivirajo ga formalin, β propiolakton in γ -sevanje.

Razmnožuje se v celicah, ki se delijo v človeškem kostnem mozgu (4).

1.3 EPIDEMIOLOGIJA

Okužbe s parvovirusom so pogoste povsod po svetu. Epidemije se večinoma pojavljajo v zimskem in pomladanskem času, največ v šolah in vrtcih.

Virus se prenaša aerogeno s kapljicami, s transfuzijo krvi ali krvnih pripravkov in vertikalno z matere na plod (5).

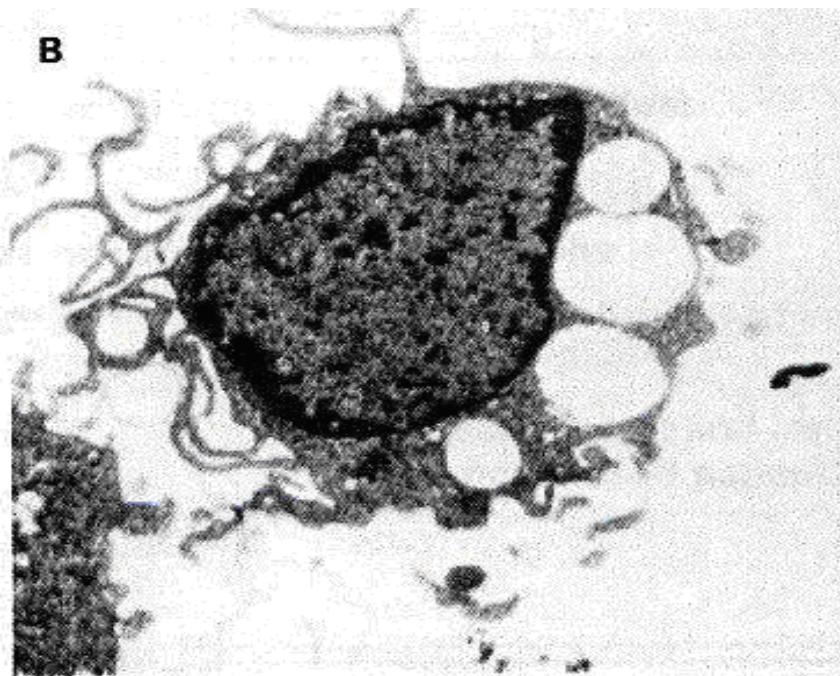
Protitelesa se najpogosteje pojavijo med četrtnim in desetim letom starosti. Pri petnajstih letih ima že približno 50 % otrok prisotna IgG protitelesa. Okužba se lahko pojavi tudi v odrasli dobi. Takrat ima že več kot 90 % ljudi specifična protitelesa proti parvovirusu B19 in ti so pred okužbo zaščiteni (2).

1.4 NASTANEK IN RAZVOJ BOLEZNI

Parvovirus B19 se večinoma razmnožuje v človeških celicah eritrocitne vrste. Prizadene kostni mozeg, retikuloendotelijski sistem, zarodne celice rdečih krvničk in eritroblaste. Vzrok za nastanek in razvoj bolezni je lahko poškodba celic zaradi citotoksičnega delovanja virusa ali pa medsebojno delovanje produktov imunskega odziva.

Virus vstopi v dihala in s pomočjo proteinskih virusnih receptorjev vdre v kri. Virusni receptor je P antigen eritrocita. Virusna DNA se lahko podvoji le, če je gostiteljeva celica v S fazi mitoze (osrednji proces je podvajanje dednega materiala).

Zaradi citotoksičnega delovanja virusa pride do značilnih sprememb na celicah. Pojavijo se proeritroblasti z vakuolami v citoplazmi, nezrelim kromatinom in velikimi eozinofilnimi inkluzijskimi telesci v jedru (slika 2). Virioni se sprostijo z lizo nuklearnih in citoplazemskih membran (4).



Slika 2: Elektronska mikroskopija - s parvovirusom B19 okužene človeške matične eritroidne celice, in vitro. Prisotne so vakuole in citoplazemski psevdopodiji (1).

1.5 KLINIČNA SLIKA

Okužba lahko poteka brez simptomov, večina pa se jih kaže z izpuščajem.

V drugem tednu po okužbi se pojavi izrazita retikulocitopenija. Nekoliko se zniža tudi celotno število belih krvničk.

Pri plodu lahko okužba v prvem trimesečju povzroči hude okvare in smrt, poznejša okužba pa okvaro miokarda in odpoved srca zaradi anemije.

Zaradi nalaganja imunskih kompleksov v stene kapilar, se v drugem tednu pojavi izpuščaj na koži (4).

1.6 PETA BOLEZEN – IZPUŠČAJ

Peta bolezen ali *erythema infectiosum* je bolezen z makulopapuloznim izpuščajem. Inkubacija traja od šest do osemnajst dni. V prodromalni fazi se pojavi vročina, glavobol, bolečine v mišicah in utrujenost. To traja od dva do tri dni.

Osemnajsti dan po okužbi izbrune bolezen. Na licih se pojavi rdečkast izpuščaj, ki ima obliko metulja. Kmalu se še po telesu in udih pojavi rdeč makulopapulozni izpuščaj, ki v središču počasi bledi (slika 3). Značilna je velika spremenljivost intenzitete izpuščaja, ki pogosto tudi srbi. Manjši del bolnikov ima ob tem še povišano telesno temperaturo, glavobol, bolečine v žrelu, trebuhu in sklepih ter povečane periferne bezgavke (4).



Slika 3: *Erythema infectiosum* - tipičen kožni izpuščaj pri peti bolezni (8).

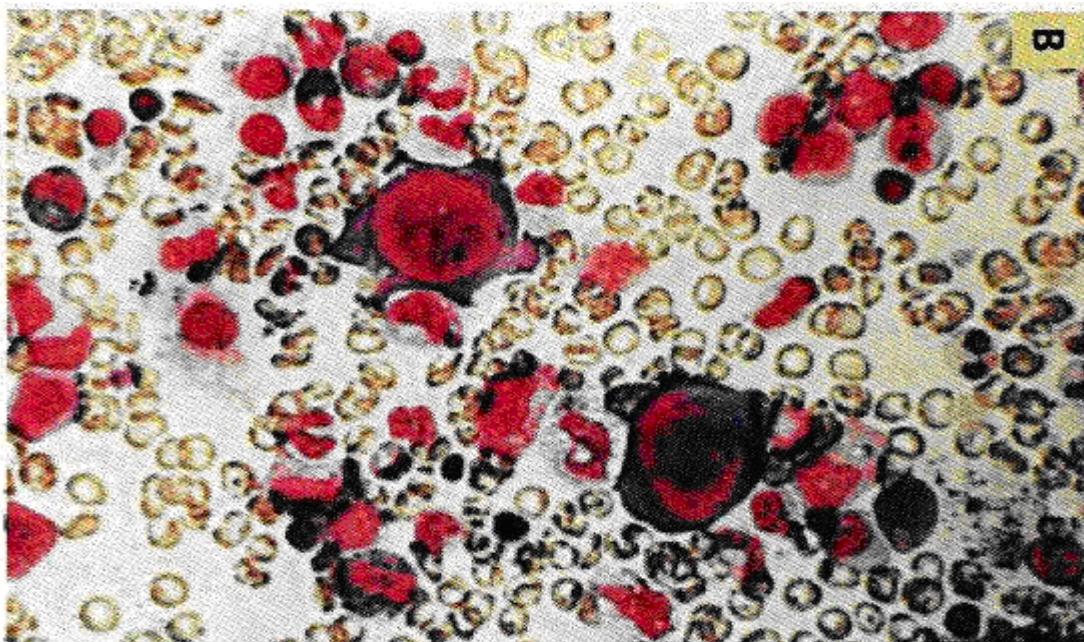
1.7 BOLEČINE IN VNETJA V SKLEPIH (ARTRITIS)

Artritis se pogosteje pojavi pri ženskah, zelo redko pri otrocih. Značilna je bolečina, oteklina in otrdelost prizadetih sklepov. Včasih je prizadet samo en sklep, najpogosteje pa so prizadeti mali sklepi rok, zapestja in nog. Virus ne povzroča destruktivnih sprememb na sklepih (4).

1.8 PRIZADETOST KRVI IN KOSTNEGA MOZGA

Kadar virus prizadene kostni mozeg, se pojavi prehodna aplastična kriza, aplazija rdečih krvnih celic in hemofagocitni sindrom. Eritropoeza je zaradi okužbe prekinjena. Pojavi se prehodna retikulocitopenija, saj je število retikulocitov zelo nizko ali pa jih nekaj dni sploh

ne moremo določiti. Rdeče krvničke prenehajo zoreti, prisotni so veliki proeritroblasti (slika 4).



Slika 4: Kostni mozeg brez zrelih eritroidnih prekurzorjev, ki imajo lastnosti velikanskih proeritroblastov (1).

Pri osebah z normalno hematopoezo se aplazija rdečih krvničk ne pojavi.

Bolnike, ki imajo katero od hemolitičnih krvnih bolezni, prehodna aplastična kriza lahko hudo prizadene. Pojavi se utrujenost, oteženo dihanje z neprijetnim občutkom napora dihalnih mišic (dispnea) in poslabšanje anemije.

Pri bolnikih z motnjami v imunskem odzivu se lahko pojavi kronična anemija.

Pogosto se nekoliko zmanjša število limfocitov, nevtrofilcev in trombocitov, ki se po treh tednih vrnejo v normalno stanje (4).

1.9 OKUŽBE PLODA

Okužba nosečnice s parvovirusom B19 je dokaj redka, saj se večina žensk okuži že pred nosečnostjo. Če se mati okuži, viremija doseže vrh po enem tednu. Približno 50 % okuženih nosečnic po dveh tednih kaže klinične znake bolezni. Podobni so znakom pri *erythema infectiosum* (kožne spremembe, glavobol, vročina, artralgija – bolečina v sklepnu).

Kmalu se pojavijo protitelesa IgM in v tem času je možnost prenosa okužbe na plod največja.

Posledica okužbe pri plodu je lahko brezsimptomna, v nasprotnem primeru pa se pojavi huda anemija, hidrops fetalis, nevrološke poškodbe ali celo fetalna smrt. Ker virus okuži jetra, je plod najbolj ranljiv v drugem trimesečju nosečnosti, ko so jetra glavni krvotvorni organ.

Okužene so lahko tudi mišične celice srca, kar povzroči vnetje srčne mišice. To pa še dodatno poslabša odpoved srca zaradi anemije.

Najpogostejši zaplet pri okužbi s parvovirusom B19 v nosečnosti je hidrops fetalis (slika 5). To je generaliziran fetalni subkutani edem s seroznim izlivom v eno ali več telesnih votlin. Z ultrazvokom ga opazimo kot podkožni edem, edem posteljice, ascites, plevrarni ali perikardialni izliv.

Poškodbe živčevja pri plodu so zelo redke (5).



Slika 5: Hidrops fetalis – okužba v drugem trimesečju (1).

1.10 DRUGI KLINIČNI POJAVI

Med okužbo s parvovirusom B19 se lahko pojavi tudi hepatitis (vnetje jeter), meningitis (vnetje ovojnic centralnega živčevja), miokarditis (vnetje srčne mišice), nefritis (vnetje ledvic) in sistemski vaskulitis (vnetje krvnih žil) (4).

1.11 PREPREČEVANJE

Ko je pri bolniku že jasno izražen izpuščaj in drugi klinični znaki okužbe, le ta ni več kužen za okolico. V času, ko je kužen, sploh ne izraža simptomov bolezni ali pa so ti zelo nespecifični. Običajni higienski ukrepi ne pripomorejo dovolj k preprečevanju okužb, saj se virus prenaša s kapljicami in je v okolju precej obstojen.

Cepivo proti parvovirusu B19 še ni v klinični uporabi. Izdelano je iz kapsidnih rekombinantnih proteinov VP1 in VP2, ter je bilo v prvi fazi kliničnega preizkusa varno in imunogeno pri 24 prostovoljcih, ki niso imeli specifičnih protiteles (5).

1.12 ZDRAVLJENJE

Specifičnega zdravila proti virusu ni. Zdravljenje je simptomatsko.

Pri artralgiji in artritisu zmanjšujemo bolečine z nesteroidnimi protivnetnimi zdravili. Zdravljenje prehodne aplastične krize pri osebah z ohranjeno imunostjo ni potrebno. Bolnikom z okvarjenim imunskim sistemom, ki imajo aplastično anemijo, lahko z intravenoznimi imunoglobulinimi končamo ali omejimo replikacijo parvovirusov. Novorojenčka z aplazijo rdečih krvničk zdravimo s pomočjo imunoglobulinov (4).

Akutna aplazija rdečih krvničk pri plodu le redko zahteva zdravljenje s transfuzijo eritrocitov.

Pri okužbi v nosečnosti pa lahko možnost za preživetje ploda izboljšamo z intrauterino aplikacijo transfuzije (5).

1.13 DIAGNOSTIKA

Laboratorijska diagnostika okužb s parvovirusom B19 je zaradi narave virusa, nastanka in razvoja bolezni ter imunskega odziva precej zapletena. Virus ne moremo vzgojiti v običajnih celičnih kulturah, saj raste le v eritroidnih progenitorih celicah kostnega mozga, v periferni krvi ali jetrih zarodka (6). Zato sta izolacija virusa in pridobivanje nativnih virusnih antigenov za uporabo v serologiji onemogočeni (5).

Najpogosteji vzorec je serum (2).

Na podlagi kliničnih znakov, kot so izpuščaj, vročina, citopenija in nizko število retikulocitov, pomislimo na okužbo s parvovirusom B19 (4). To potrujemo z različnimi laboratorijskimi diagnostičnimi metodami. Lahko ugotavljamo prisotnost virusa, virusne DNA ali specifičnih protiteles IgM in IgG.

NEPOSREDNO DOKAZOVANJE VIRUSA:

Najpogosteje ugotavljamo prisotnost virusne DNA, zlasti pri bolnikih, ki imajo slab imunski odziv, saj lahko zaznamo le nizke koncentracije specifičnih protiteles.

Najboljša metoda za dokazovanje virusne DNA je verižna reakcija s polimerazo (PCR). Problem lahko predstavlja, da pri nekaterih bolnikih lahko ostane virusna DNA v serumu ali plazmi zelo dolgo časa, tudi več let po akutni okužbi. To je še posebej izrazito v tkivih.

Virusno DNA lahko izoliramo iz svežih, zamrznjenih ali fiksiranih vzorcev tkiv. V tem primeru uporabljamo imunohistokemijske metode ali *in situ* hibridizacijo. Pri diagnostiki tkiv fetusa ali kostnega mozga pa so najpogosteje standardne patološke metode (2).

DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES:

Prisotnost specifičnih protiteles ugotavljamo z različnimi serološkimi metodami. Uporabljamo imunofluorescenčno metodo, metodo imunoblot, encimsko imunske teste ali kemiluminiscenčno metodo.

Za ugotavljanje nedavne okužbe s parvovirusom B19 dokazujemo specifična protitelesa IgM. Ta se vežejo s protitelesi proti humanim μ -verigam. Visoke koncentracije specifičnih protiteles IgM se pojavi po treh do štirih dneh po razvoju bolezenskih simptomov.

Pri bolnikih z aplastično krizo se pojavi šele po sedmih do desetih dneh. Če so rezultati v serumu, ki smo ga odvzeli po desetih dneh, nezanesljivi ali negativni, je potrebno serum

testirati še za virusno DNA in vzeti še en vzorec po približno štirinajstih dneh od pojava bolezni.

Specifična protitelesa IgM lahko zaznamo še po dveh do treh mesecih po akutni okužbi. Če po tem obdobju odvzamemo vzorec, so njihove koncentracije zelo nizke in jih je težko interpretirati, zato nam je v pomoč testiranje vzorcev za prisotnost specifičnih protiteles IgG.

Specifična protitelesa IgG začnejo nastajati vzporedno z nastanjem protiteles IgM. Pojavijo se po približno sedmih dneh bolezni in ostanejo v telesu doživljensko. Relativno visoke koncentracije protiteles IgG ostanejo v bolnikovem serumu še dvanajst mesecev po okužbi (2). Z določanjem specifičnih protiteles IgG dokazujemo prebolelo okužbo s parvovirusom B19.

Specifična protitelesa so usmerjena proti linearnim in konformacijskim epitopom VP1 in VP2. Reaktivnost protiteles IgG proti konformacijskim epitopom po preboleli okužbi ostane, reaktivnost proti linearnim epitopom pa v šestih mesecih izgine.

V serumu tako dokazujemo protitelesa IgM in IgG s serološkimi metodami, pri katerih uporabljamo rekombinantne proteine parvovirusa B19 (3). Ker se protitelesa IgM iz serumata bolnika vežejo s protitelesi proti humanim μ -verigam, se imunski metodi za določanje IgG in IgM nekoliko razlikujeta.

DIAGNOSTIKA OKUŽB V NOSEČNOSTI

Večina okužb pri nosečnicah poteka brez simptomov in jih zato v času akutne okužbe težko opazimo. Največkrat šele ginekolog z ultrazvočno preiskavo ugotovi nepravilnosti pri plodu.

Serološke metode za ugotavljanje okužbe pri plodu niso primerne, saj ponavadi odkrijemo le še visoko vrednost specifičnih protiteles IgG, specifična protitelesa IgM pa lahko že izginejo iz obtoka.

Zato je nujna uporaba molekularnih metod, pri katerih določamo virusno DNA v fetalnem vzorcu serumata ali amnijske tekočine. Vsekakor je potrebno laboratorijske rezultate skrbno primerjati s kliničnimi podatki nosečnice in ploda, pa tudi z epidemiološkimi podatki o okužbah in epidemijah, povzročenih s parvovirusom B19 v določenem okolju (5).

1.13.1 ENCIMSKO IMUNSKI TEST (ELISA)

ELISA je serološka metoda, s katero ugotavljamo prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgM proti parvovirusu B19 v človeški plazmi ali serumu (4).

Virusna specifičnost protiteles je določena z virusnimi antigeni, ki so vezani na trdni fazi. Nanje se vežejo specifična protiteesa, ta pa detektiramo s pomočjo monoklonskih protiteles, ki so označena z encimom (2). Dodatek substrata omogoča, da se pozitivni vzorci obarvajo. Pomemben pa je tudi »stop« reagent, ki zaustavi reakcijo. S spektrofotometrom merimo absorbanco, ki je sorazmerna količini specifičnih protiteles proti parvovirusu B19.

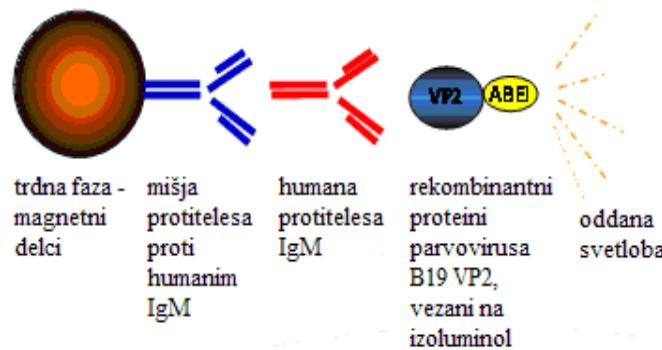
1.13.2 METODA KEMILUMINISCENCE (CLIA)

Metoda kemiluminiscence je kvalitativna ali kvantitativna serološka metoda, ki jo uporabljamo za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM proti parvovirusu B19 v človeški plazmi ali serumu.

Virusna specifičnost protiteles je določena z virusnimi antigeni, na katere se vežejo specifična protiteesa. Te pa detektiramo z monoklonskimi protitelesi, ki so označeni z derivatom izoluminola. Spektrofotometer izmeri emisijo svetlobe, ki je sorazmerna količini specifičnih protiteles.

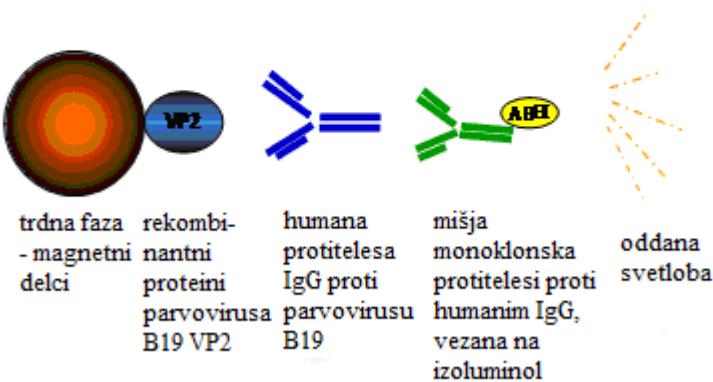
Princip merjenja prisotnosti protiteles IgM in IgG proti parvovirusu B19 z metodo kemiluminiscece prikazujeta sliki 6 in 7 (9, 10).

Določanje protiteles IgM



Slika 6: Prikaz določanja IgM protiteles z imunsko metodo kemiluminiscence (vir: gradivo proizvajalca, Diasorin, Saluggia, Italija).

Določanje protiteles IgG



Slika 7: Prikaz določanja IgG protiteles z imunsko metodo kemiluminiscence (vir: gradivo proizvajalca, Diasorin, Saluggia, Italija).

1.13.3 METODA IMUNOBLOT

Imunoblot je kvalitativna in vitro metoda, s katero odkrivamo specifična protitelesa IgG in IgM proti parvovirusu B19 v človeškem serumu ali plazmi.

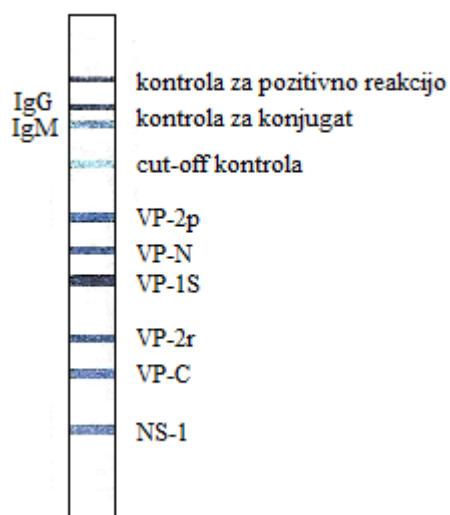
Identifikacija protiteles je mogoča s pomočjo rekombinantnih antigenov, ki so nanešeni na nitrocelulozno membrano v obliki črt. Nanje se vežejo specifična protitelesa iz seruma ali plazme. Na vezana človeška protitelesa se nato vežejo monoklonska protitelesa z vezanim encimom. Dodatek substrata pa omogoči, da se pozitivni rezultatiobarvajo.

V primerjavi z metodo ELISA, nam ta metoda posreduje dodatne informacije o stanju oziroma času okužbe s pomočjo določanja avidnosti protiteles in reaktivnosti specifičnih protiteles proti posameznim vrstam epitopov.

Pomen posameznih rekombinantnih epitopov je različen:

- VP2 je glavni kapsidni protein, sestavljen iz konformacijskih epitopov VP-2p in linearnih epitopov VP-2r. Protitelesa IgG, usmerjena proti VP-2p epitopom so ponavadi prisotna doživljensko, medtem ko so tista, usmerjena proti VP-2r epitopom, zaznavna več mesecev do nekaj let. Reaktivnost obeh vrst epitopov s protitelesi IgG in IgM je dobra v zgodnji fazi okužbe.
- VP-N je N-terminalni del kapsidnega proteina VP1. Protitelesa IgG usmerjena proti VP-N epitopom pogosto lahko določamo več let.
- VP-C je C-terminalni del kapsidnih proteinov VP1 in VP2. Reaktivnost protiteles IgG in IgM z linearimi epitopi se pojavi zgodaj in izgine kmalu po končani v okužbi s parvovirusom B19.
- VP-1S je N-terminalni del kapsidnega proteina VP1, v katerem se razlikuje od VP2. Protitelesa IgG proti VP-1S epitopom lahko določamo še dolgo po preboleli okužbi.
- Protitelesa IgG proti nestrukturnemu proteinu NS-1 se najhitreje pojavijo v 6 do 8 tednih po okužbi pri 20 % bolnih in kažejo na obstojnost virusa v krvi. Ta protitelesa največkrat najdemo pri bolnikih, ki imajo parvovirusni artritis ali ostale kronične okužbe in ne pri tistih z akutnimi okužbami. Določanje protiteles proti NS-1 epitopom je potrebno vedno potrditi z dokazovanjem virusne DNA s PCR.

S tem testom lahko dokazujemo tudi avidnost specifičnih protiteles IgG. To je imunološka trdnost vezanja protiteles z antigeni. Kadar dokažemo nizko avidnost protiteles, gre za zgodnjo fazo okužbe, medtem ko visoka avidnost pomeni stanje po preboleli okužbi (13).



Slika 8: Trak *recomLine* parvovirus B19 IgG / IgM (13).

2 NAMEN

V diplomske nalogi smo primerjali nov diagnostični komplet proizvajalca DiaSorin, ki temelji na metodi kemiluminiscence z že obstoječo metodo encimsko imunskega testa istega proizvajalca. Želeli smo ugotoviti, ali je nova metoda enako ali bolj občutljiva od metode, ki temelji na encimsko imunski tehniki, saj ima le ta veliko prednost, ker je avtomatizirana, hitrejša, enostavnejša, cenejša in so rezultati testiranja na voljo že v istem dnevu. Pregledali smo 251 serumskih vzorcev, odvzetih v letu 2009, pacientom različnih starosti in spola. Primerjali smo rezultate obeh metod in ugotavljali njihovo ujemanje. Tiste vzorce, ki so imeli neskladne rezultate smo testirali še z metodo imunoblot, da smo lahko razložili neujemanje rezultatov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

Serološko testiranje za okužbo s parvovirusom B19 opravljajo v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Najpogosteje uporabljajo serum ali plazmo. Kadar se test izvede v istem dnevu, so vzorci do testiranja shranjeni pri sobni temperaturi od 20°C do 25°C. Če vzorcev ne testiramo takoj, jih lahko hranimo v hladilniku dva do tri dni pri T 2°C do 8°C, sicer pa jih je potrebno zamrzniti pri -20°C.

Antikoagulanti, kot so EDTA, citrat ali heparin ne motijo rezultatov testiranja. Močno hemolizirane, lipemične ali ikterične vzorce pa je potrebno odstraniti iz analize. Prav tako se moramo izogibati zračnim mehurčkom v vzorcu. Večkratno zamrzovanje in odmrzovanje vzorca ni priporočljivo.

Za izvedbo diplomske naloge smo pregledali 251 serumskih vzorcev, odvzetih v letu 2009. Pacienti so bili anonimni, različnega spola in starosti. Vsi so bili poslani v redno diagnostiko s sumom na okužbo s parvovirusom B19.

Ker so bili vzorci zamrznjeni, smo jih pred testiranjem premešali.

3.2 METODE

V diplomski nalogi smo primerjali nov diagnostični komplet proizvajalca DiaSorin, Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG in IgM, ki temelji na metodi kemiluminiscence z že obstoječo metodo encimsko imunskega testa istega proizvajalca. Nekatere vzorce, ki so imeli neskladne rezultate smo testirali še z metodo imunoblot. Upoštevali smo navodila in postopke proizvajalca. Prav tako smo delo opravljali v skladu z vsemi varnostnimi pravili v laboratoriju.

3.2.1 BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgG ELISA (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)

Encimsko imunski test parvovirus B19 IgG je namenjen kvalitativnemu ugotavljanju prisotnosti IgG protiteles proti parvovirusu B19 v človeškem serumu ali plazmi. Test se uporablja kot pokazatelj prebolele okužbe pri vseh pacientih, kjer obstaja sum na okužbo s parvovirusom B19. Če so rezultati pozitivni, pomeni da je pacient imun na parvovirus B19, v nasprotnem primeru pa je še vedno dovzet za okužbo.

Test lahko izvajamo z različnimi avtomatskimi in polavtomatskimi ELISA procesorji. Mi smo uporabili polavtomatskega (11).

PRINCIP TESTA:

Metoda je indirektna. Na mikrotiterski ploščici so pritrjeni rekombinantni proteini VP2, na katere se vežejo parvovirusna protitelesa IgG iz vzorca seruma. Po spiranju dodamo zajčja protitelesa IgG z vezano peroksidazo, ki se vežejo na parvovirusna IgG. Ob dodatku tetrametilbenzidin (TMB) substrata se nastali kompleksi obarvajo modro. Stop reagent modre komplekse pretvori v stabilne rumene produkte, katerih absorbanco merimo s fotodetektorjem pri valovnih dolžinah od 450 do 630 nm (11).

INTERPRETACIJA IN VREDNOTENJE REZULTATOV:

Prisotnost specifičnih protiteles IgG določimo glede na izračunane mejne vrednosti kontrole (COV – cut-off value). Iz vrednosti absorbanc obeh kontrol izračunamo srednjo vrednost, nato pa določimo spodnjo in zgornjo mejo.

Spodnja meja: $COV \times 0,9$

Zgornja meja: $COV \times 1,1$

ABSORBANCA:

- Vzorci, ki imajo vrednost absorbance višjo od vrednosti $COV \times 1,1$ vsebujejo specifična protitelesa IgG.
- Vzorci, ki imajo vrednost absorbance manjšo od vrednosti $COV \times 0,9$ ne vsebujejo specifičnih protiteles IgG.
- Vzorci, ki imajo vrednost absorbance med vrednostima $COV \times 0,9$ in $COV \times 1,1$ so nedoločljivi.

INDEKS:

Če uporabljam avtomatski čitalec, le ta sam preračuna vrednost indeksa, pri čemer je absorbanca vzorca izražena glede na COV kontrolnih vzorcev.

$$\text{indeks} = \frac{\text{absorbanca vzorca}}{\text{COV}}$$

- Vzorci, ki imajo vrednost indeksa višjo od 1,1 vsebujejo specifična protitelesa IgG.
- Vzorci, ki imajo vrednost indeksa manjšo od 0,9 ne vsebujejo specifičnih protiteles IgG.
- Vzorci, ki so nedoločljivi, imajo vrednosti med 0,9 in 1,1.

Vzorce z mejnimi rezultati moramo ponovno testirati. Če so pri drugem testiranju rezultati zopet nedoločljivi, moramo vsaj teden kasneje vzeti nov vzorec in ga testirati. Če še pri drugem testiranju dobimo rezultat mejne vrednosti, se ta upošteva kot negativen (11).

NEGATIVNI REZULTATI:

Če je rezultat negativen, preiskovani ni okužen s parvovirusom B19. Kljub temu obstaja možnost, da gre za zelo zgodnjo fazo akutne virusne okužbe in se specifična protitelesa še niso začela proizvajati ali pa so prisotna v nezaznavni količini. IgG protitelesa se pojavijo po približno sedmih dneh bolezni.

Če vseeno sumimo, da je bil pacient izpostavljen okužbi s parvovirusom B19, je potrebno odvzeti nov vzorec in ga ponovno testirati za prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG v času okužbe.

POZITIVNI REZULTATI:

Pozitiven rezultat je dokaz, da so specifična protitelesa IgG prisotna. Običajno gre za imunost po preboleli virusni okužbi.

3.2.2 BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgM ELISA (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)

Encimsko imunski test parvovirus B19 IgM je namenjen kvalitativnemu ugotavljanju prisotnosti protiteles IgM proti parvovirusu B19 v človeškem serumu ali plazmi. Uporabljamo ga kot pokazatelj nedavne oz. akutne okužbe pri vseh pacientih, kjer obstaja sum na okužbo s parvovirusom B19.

Test lahko izvajamo z različnimi avtomatskimi in polavtomatskimi ELISA procesorji. Mi smo uporabili polavtomatskega (12).

PRINCIP TESTA:

Gre za t.i. » μ -capture« ELISA test. Vsa humana protitelesa IgM iz seruma se vežejo na zajčja protitelesa IgM, ki so na mikrotiterski ploščici. Po spiranju dodamo rekombinantne proteine VP2, ki imajo vezan biotin in se vežejo na prisotna parvovirusna protitelesa IgM. Ko drugič speremo, dodamo streptavidin z vezano peroksidazo, ki se veže na VP2 proteine. Ob dodatku TMB, se nastali kompleksi zaradi reakcije med TMB in peroksidazo obarvajo modro. Na koncu stop reagent pretvori modre komplekse v stabilne produkte rumene barve. Te detektiramo s fotodetektorjem pri valovni dolžini od 450 do 630 nm (12).

INTERPRETACIJA IN VREDNOTENJE REZULTATOV:

Prisotnost specifičnih protiteles IgM določimo glede na izračunane mejne vrednosti kontrole (COV – cut-off value). Iz vrednosti absorbanc obeh kontrol izračunamo srednjo vrednost, nato pa določimo spodnjo in zgornjo mejo.

Spodnja meja: COV \times 0,9

Zgornja meja: COV \times 1,1

ABSORBANCA:

- Vzorci, ki imajo vrednost absorbance višjo od vrednosti COV \times 1,1 vsebujejo specifična protitelesa IgM.
- Vzorci, ki imajo vrednost absorbance manjšo od vrednosti COV \times 0,9 ne vsebujejo specifičnih protiteles IgM.

- Nedoločljivi vzorci imajo vrednost absorbance med vrednostima $COV \times 0,9$ in $COV \times 1,1$

INDEKS:

Če uporabljam avtomatski čitalec, le ta sam preračuna vrednost indeksa, pri čemer je absorbanca vzorca izražena glede na COV kontrolnih vzorcev.

$$\text{indeks} = \frac{\text{absorbanca vzorca}}{COV}$$

- Vzorci, ki imajo vrednost indeksa višjo od 1,1 vsebujejo specifična protitelesa IgM.
- Vzorci, ki imajo vrednost indeksa manjšo od 0,9 ne vsebujejo specifičnih protiteles IgM.
- Vzorci, ki so nedoločljivi, imajo vrednosti med 0,9 in 1,1.

Vzorce z mejnimi rezultati moramo ponovno testirati. Če so pri drugem testiranju rezultati zopet v mejnem območju, moramo vsaj teden kasneje vzeti nov vzorec in ga testirati. Če še pri drugem testiranju dobimo rezultat mejne vrednosti, se ta upošteva kot negativen (12).

NEGATIVNI REZULTATI:

Negativen rezultat pomeni, da preiskovanec ni okužen s parvovirusom B19, vendar to ne izključuje možnosti akutne okužbe. Ta je lahko v tako zgodnji fazi, da se protitelesa še niso začela proizvajati ali pa so prisotna v nezaznavni količini. IgM protitelesa lažje določimo v zgodnji fazi okužbe, saj kasneje močno upadajo.

Če kljub negativnim rezultatom sumimo na izpostavljenost okužbi s parvovirusom B19, je potrebno vsaj en teden kasneje ponovno vzeti vzorec in ga testirati za prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG.

POZITIVNI REZULTATI:

Pozitiven rezultat je dokaz, da so prisotna specifična protitelesa IgM in gre za nedavno akutno okužbo.

3.2.3 LIAISON BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgG (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)

Test Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG je imunska metoda, ki temelji na principu kemiluminiscence in se uporablja za kvalitativno določanje prisotnosti specifičnih protiteles IgG proti parvovirusu B19 v človeški plazmi ali serumu. Test v celoti izvajamo na analizatorju Liaison (9).

PRINCIP TESTA

Test je indirektna sendvič imunska metoda kemiluminiscence. Trdna faza je prekrita z rekombinantnimi proteini VP2, na katere se med prvo inkubacijo vežejo specifična protitelesa IgG proti parvovirusu B19. Po spiranju dodamo izoluminol, vezan z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti humanim protitelesom IgG. Ta konjugat reagira s specifičnimi protitelesi IgG, ki so vezani na trdni fazi. Na koncu dodamo start reagent, ki sproži reakcijo kemiluminiscence. Količina konjugata antigen-izoluminol, ki je vezana na specifična IgG protitelesa, je sorazmerna količini svetlobnih signalov, katere merimo s fotodetektorjem (9).

INTERPRETACIJA IN VREDNOTENJE REZULTATOV:

Analizator avtomatsko izračuna nivo specifičnih protiteles IgG proti parvovirusu B19 in jih izrazi kot indeks ter oceni rezultate.

INDEKS:

Testno območje sega od vrednosti indeksa 0,1 do 46.

- Vzorci, ki imajo vrednost višjo od 1,1 vsebujejo specifična protitelesa IgG.
- Vzorci, ki imajo vrednost manjšo od 0,9 ne vsebujejo specifičnih protiteles IgG.
- Nedoločljivi vzorci imajo vrednost med 0,9 in 1,1.

Vzorce, ki imajo nedoločljive rezultate oz. mejne vrednosti, je potrebno ponovno testirati. Če so pri ponovnem testiranju rezultati pozitivni, vzorci vsebujejo specifična protitelesa IgG in obratno. Tistim pacientom, katerih vzorci imajo zopet mejne rezultate, je potrebno odvzeti nov vzorec po enem tednu in test ponoviti (9).

NEGATIVNI REZULTATI:

Negativen rezultat pomeni, da preiskovani ni okužen s parvovirusom B19. Kljub temu obstaja možnost, da gre za zelo zgodnjo fazo akutne virusne okužbe in se specifična protitelesa še niso začela proizvajati ali pa so prisotna v nezaznavni količini. Rezultati testa Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG so v prvih tednih virusne okužbe vedno negativni, saj se IgG protitelesa pojavijo približno po sedmih dneh bolezni.

Če kljub negativnim rezultatom še vedno sumimo, da je bil pacient izpostavljen okužbi s parvovirusom B19, je potrebno odvzeti nov vzorec in ga ponovno testirati za prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG v času okužbe (9).

POZITIVNI REZULTATI:

Pozitiven rezultat testa Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG dokazuje prisotnost specifičnih protiteles IgG in običajno pomeni imunost na prebolelo virusno okužbo (9).

3.2.4 LIAISON BIOTRIN PARVOVIRUS B19 IgM (Biotrin International Ltd., Dublin, Irska)

Test Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgM je imunska metoda, ki temelji na principu kemiluminiscence in se uporablja za kvalitativno določanje prisotnosti specifičnih protiteles IgM proti parvovirusu B19 v človeški plazmi ali serumu. Test v celoti izvajamo na analizatorju Liaison (10).

PRINCIP TESTA

Gre za » μ -capture« sendvič imunsko metodo kemiluminiscence. Trdna faza je prekrita z mišjimi protitelesi proti humanim protitelesom IgM, na katere se vežejo humana protitelesa IgM iz kalibracijskih raztopin, kontrol in vzorcev seruma. Po spiranju dodamo rekombinantne proteine parvovirusa B19 VP2, vezane na izoluminol (konjugat izoluminol-antigen). Ti reagirajo s specifičnimi protitelesi IgM, ki so vezani na mišjih protitelesih na trdni fazi. Na koncu dodamo start reagent, ki sproži reakcijo kemiluminiscence. Količina konjugata antigen-izoluminol, ki je vezana na specifična protitelesa IgM, je sorazmerna količini svetlobnih signalov, katere merimo s fotodetektorjem (10).

INTERPRETACIJA IN VREDNOTENJE REZULTATOV:

Analizator avtomatsko izračuna nivo specifičnih protiteles IgM proti parvovirusu B19 in jih izrazi kot indeks ter oceni rezultate.

INDEKS:

Testno območje sega od vrednosti indeksa 0,1 do 48.

- Vzorci, ki imajo vrednost višjo od 1,1 vsebujejo specifična protitelesa IgM.
- Vzorci, ki imajo vrednost manjšo od 0,9 ne vsebujejo specifičnih protiteles IgM.
- Nedoločljivi vzorci imajo vrednost med 0,9 in 1,1.

Vzorce, ki imajo nedoločljive rezultate oz. mejne vrednosti, je potrebno ponovno testirati. Če so pri ponovnem testiranju rezultati pozitivni, vzorci vsebujejo specifična protitelesa IgM in obratno. Tistim pacientom, katerih vzorci imajo zopet nedoločljive rezultate, je potrebno odvzeti nov vzorec po enem tednu in test ponoviti (10).

NEGATIVNI REZULTATI:

Preiskovanec naj ne bi bil okužen, če je rezultat negativen, vendar to ne izključuje možnosti akutne okužbe, saj je le ta lahko v tako zgodnji fazi, da se protitelesa še niso začela proizvajati ali pa so prisotna v nezaznavni količini. Protitelesa IgM lažje določimo v zgodnji fazi okužbe, saj kasneje močno upadajo. Če kljub negativnim rezultatom sumimo na izpostavljenost okužbi s parvovirusom B19, je potrebno vsaj en teden kasneje ponovno vzeti vzorec in ga testirati za prisotnost IgM in IgG (10).

POZITIVNI REZULTATI:

Kadar je rezultat pozitiven, gre za nedavno akutno okužbo. Pozitivni rezultati za protitelesa IgM so pogosti v zgodnji fazi okužbe, v poznejših stadijih pa so zelo redki (10).

3.2.5 RECOMLINE PARVOVIRUS B19 IgG [AVIDNOST] / IgM (Mikrogen diagnostik, Neuried, Nemčija)

RecomLine Parvovirus B19 IgG [avidnost] / IgM je kvalitativen in vitro test, s katerim odkrivamo specifična protitelesa IgG in IgM ter določamo avidnost protiteles IgG proti

parvovirusu B19 v človeški plazmi ali serumu. Gre za encimsko imunsko metodo, pri kateri uporabljamo različne vrste rekombinantnih antigenov, ki so pritrjeni na nitrocelulozno membrano. Test se v celoti izvaja ročno, rezultate pa odčitamo brez uporabe analizatorjev (13).

PRINCIP TESTA:

Visoko očiščeni, rekombinantni proteini so nanešeni na nitrocelulozno membrano v obliki črt. Specifična protitelesa proti parvovirusu B19 iz serumskega vzorca se vežejo na ustrezne proteine na membrani. S spiranjem odstranimo nevezana protitelesa in membrano inkubiramo z zajčjimi monoklonskimi protitelesi proti humanim IgG ali IgM, ki imajo vezano hrenovo peroksidazo. Peroksidaza katalizira barvno reakcijo in tako pojavi temen pas na mestu, kjer pride do vezave protitelo-antigen.

Na zgornjem koncu traku je pet kontrolnih pasov, da potrdijo pravilnost testa:

- Kontrola za pozitivno reakcijo, ki se mora obarvati v vsakem serumskem vzorcu.
- Dve kontroli za konjugat – ena za protitelesa IgG in druga za protitelesa IgM. Obarva se tisti pas, katerega razred protiteles določamo.
- Cut-off kontrola za vrednotenje rezultatov, glede na intenzitetu obarvanja (13).

INTERPRETACIJA IN VREDNOTENJE REZULTATOV:

Trakove z obarvanimi pasovi odčitamo s prostim očesom.

Pas mora biti vsaj enako obarvan, kot je obarvan pas cut-off kontrole. Če je manj intenzivno obarvan, gre za mejno vrednost.

Specifična protitelesa IgG:

- Če se noben pas ne obarva, vzorec ne vsebuje specifičnih protiteles IgG.
- Če je obarvan pas s proteini VP-N, VP-2r ali VP-C, gre za mejne vrednosti.
- Če je obarvan pas s proteini VP-2p ali dva pasova s proteini VP-N, VP-1S, VP-2r ali VP-C, vzorec vsebuje specifična protitelesa IgG.

Specifična protitelesa IgM:

- Če se noben pas ne obarva, vzorec ne vsebuje specifičnih protiteles IgM.
- Če je obarvan pas s proteini VP-N, VP-2r, VP-C ali VP-1S, gre za mejne vrednosti.

- Če sta obarvana dva pasova s proteini VP-2p, VP-N, VP-1S, VP-2r ali VP-C, vzorec vsebuje specifična protitelesa IgM.

Vzorce, ki imajo nezanesljive rezultate je potrebno ponovno testirati po dveh ali treh tednih (13).

NEGATIVNI REZULTATI:

Negativni rezultat ne izključuje možnosti okužbe. Lahko gre za lažno negativne rezultate, kadar je okužba v zgodnji fazi in se protitelesa še niso začela proizvajati (13).

POZITIVNI REZULTATI PRI DOLOČANJU SPECIFIČNIH PROTITELES IgG:

Kadar so prisotna protitelesa IgG proti VP-2p in VP-N (ponavadi skupaj z VP-1S) proteinom parvovirusa B19, gre za prebolelo okužbo.

Prisotnost protiteles IgG proti VP-C in VP-2r proteinom parvovirusa B19 pomeni, da gre za akutno okužbo. Prisotnost protiteles IgG proti VP-C ponavadi pomeni nedavno prebolelo okužbo. V primerih, ko se pojavi močna reaktivnost protiteles IgG proti VP-2r, protitelesa proti VP-C pa niso prisotna ali pa je reaktivnost zelo šibka, gre za zgodnjo fazo okužbe. Količina protiteles proti VP-C v tem primeru še narašča (13).

POZITIVNI REZULTATI PRI DOLOČANJU SPECIFIČNIH PROTITELES IgM:

Prisotna protitelesa IgM kažejo na akutno okužbo v zgodnji fazi.

Šibka reaktivnost s protitelesi IgM pa lahko pomeni, da gre za trajno prisotna protitelesa IgM zaradi okužbe v preteklosti ali pa so se reaktivirala protitelesa IgM drugih virusnih okužb (13).

3.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Občutljivost metode nam pove, kako nizko koncentracijo protiteles test še zazna, kar pomeni da poda pozitivni rezultat, če vzorec vsebuje protitelesa, ki jih iščemo.

Specifičnost metode pomeni, da test zazna samo tista protitelesa, ki jih določamo in ga druga protitelesa, ki so v vzorcu ne motijo pri določitvi. Če vzorec ne vsebuje iskanih protiteles, mora test podati negativni rezultat.

Metodi Biotrin Parvovirus B19 IgG/IgM ELISA in Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG/IgM smo ovrednotili z izračunom specifičnosti in občutljivosti, ki smo jih podali v odstotkih.

$$\text{občutljivost} (\%) = \frac{\text{resnično pozitivni}}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}} \times 100\%$$

$$\text{specifičnost} (\%) = \frac{\text{resnično negativni}}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}} \times 100\%$$

4 REZULTATI

Za izdelavo diplomske naloge smo primerjali nov diagnostični komplet proizvajalca DiaSorin, Liaison Biotrin Parvovirus B19 IgG in IgM, ki temelji na metodi kemiluminiscence z že obstoječo metodo encimsko imunskega testa istega proizvajalca.

Testirali smo 251 serumskih vzorcev anonimnih oseb, od 1 do 76 leta starosti. Od tega je bilo 97 moških in 154 žensk. Končne rezultate obeh testov smo primerjali med seboj.

Rezultate z mejnimi vrednostmi smo iz analize izločili, ker jih ne moremo interpretirati.

Na koncu smo obravnavali 241 serumskih vzorcev, od tega 92 moških in 149 žensk.

Rezultate obeh testov smo primerjali, neskladne pa smo še dodatno potrjevali z metodo imunoblot in poskušali ugotoviti, katera od metod je dala lažne rezultate.

4.1 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES IgG

Tabela II: Primerjava rezultatov metode Biotrin ELISA z metodo kemiluminisce Liaison Biotrin pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG.

	Metoda kemiluminisce Liaison IgG		
Metoda Biotrin ELISA IgG	Negativni	Pozitivni	Skupaj
Negativni	70 (29,0 %)	0 (0,0 %)	70 (29,0 %)
Pozitivni	5 (2,1 %)	166 (68,9 %)	171 (71,0 %)
Skupaj	75 (31,1 %)	166 (68,9 %)	241 (100 %)

Tabela II prikazuje primerjavo rezultatov metode Biotrin ELISA z metodo kemiluminiscence Liaison Biotrin.

Pri testiranju za prisotnost specifičnih protiteles IgG, smo z metodo ELISA dobili 171 pozitivnih in 70 negativnih rezultatov. Z metodo kemiluminiscence pa smo pri 166 vzorcih dokazali specifična protitelesa IgG, pri 75 vzorcih nismo dokazali specifičnih protiteles IgG.

236 oz. 98 % rezultatov obeh metod se je ujemalo med seboj, 5 oz. 2 % rezultatov je bilo neskladnih. Vseh 5 je bilo pozitivnih pri metodi ELISA in negativnih pri metodi kemiluminiscence.

4.2 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES IgM

Tabela III: Primerjava rezultatov metode Biotrin ELISA z metodo kemiluminiscence Liaison Biotrin pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM.

	Metoda kemiluminiscence Liaison IgM		
Metoda Biotrin ELISA IgM	Negativni	Pozitivni	Skupaj
Negativni	223 (92,5 %)	5 (2,1 %)	228 (94,6 %)
Pozitivni	0 (0,0 %)	13 (5,4 %)	13 (5,4 %)
Skupaj	223 (92,5 %)	18 (7,5 %)	241(100 %)

V tabeli III smo primerjali rezultate določanja prisotnosti protiteles IgM z encimsko imunsko metodo in metodo kemiluminiscence.

Z metodo ELISA smo pri 13 serumskih vzorcih dokazali specifična protitelesa IgM, pri 228 vzorcih pa nismo dokazali specifičnih protiteles IgM. Z metodo kemiluminiscence pa

smo dokazali, da je 18 vzorcev vsebovalo specifična protitelesa IgM, pri 223 vzorcih nismo dokazali specifičnih protiteles IgM.

236 oz. 98 % rezultatov obeh metod se je ujemalo med seboj, 5 oz. 2 % rezultatov pa je bilo neujemajočih. Vseh 5 rezultatov je bilo pozitivnih pri metodi kemiluminiscence in negativnih pri metodi ELISA.

4.3 NESKLADNI REZULTATI

10 vzorcev je imelo neskladne rezultate. Tabeli IV in V prikazujeta, da je bilo 5 vzorcev pozitivnih pri testiranju za specifična protitelesa IgG z metodo ELISA in negativnih z metodo kemiluminiscence. 5 vzorcev pa je bilo negativnih pri testiranju za specifična protitelesa IgM z metodo ELISA in pozitivnih z metodo kemiluminiscence. Od teh vzorcev so trije vsebovali specifična protitelesa IgG, dva vzorca jih nista vsebovala.

Tabela IV: Prikaz in primerjava neskladnih rezultatov metode Biotrin ELISA z metodo kemiluminiscence Liaison Biotrin pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG.

	Metoda kemiluminiscence Liaison IgG		
Metoda Biotrin ELISA IgG	Negativni	Pozitivni	Skupaj
Negativni	0	0	0
Pozitivni	5	0	5
Skupaj	5	0	5

Tabela V: Prikaz in primerjava neskladnih rezultatov metode Biotrin ELISA z metodo kemiluminiscence Liaison Biotrin pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM.

		Metoda kemiluminiscence Liaison IgM		
Metoda Biotrin ELISA IgM		Negativni	Pozitivni	Skupaj
Negativni	0	5	5	
Pozitivni	0	0	0	
Skupaj	0	5	5	

4.4 REZULTATI TESTA IMUNOBLOT

Da bi ugotovili pravilnost rezultatov, smo vzorce z neskladnimi rezultati dodatno testirali z metodo imunoblot. Vzorce, ki so imeli pri določenih rekombinantnih antigenih rezultat mejne vrednosti, smo interpretirali kot pozitivne.

Pri testiranju za prisotnost specifičnih protiteles IgG sta dva vzorca vsebovala iskana protitelesa, v treh vzorcih specifičnih protiteles IgG nismo dokazali.

Prav tako smo z metodo imunoblot v enem vzorcu dokazali specifična protitelesa IgM, ostali štirje vzorci niso vsebovali specifičnih protiteles IgM. Rezultate prikazujeta tabeli VI in VII.

Tabela VI: Prikaz prisotnosti specifičnih protiteles IgG proti določenim rekombinantnim antigenom pri vzorcih, ki so imeli neskladne rezultate z metodama Biotrin ELISA in Liaison Biotrin.

Proteini Vzorec \	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Rezultat
1	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
2	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
3	Pozitiven	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Pozitiven
4	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
5	MV	Pozitiven	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Pozitiven

Tabela VII: Prikaz prisotnosti specifičnih protiteles IgM proti določenim rekombinantnim antigenom pri vzorcih, ki so imeli neskladne rezultate z metodama Biotrin ELISA in Liaison Biotrin.

Proteini Vzorec \	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Rezultat
1	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
2	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
3	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
4	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen	Negativen
5	MV	Negativen	Negativen	Negativen	MV	MV	Pozitiven

4.5 KONČNI REZULTATI

Test imunoblot smo uporabili za potrditveni test. Kot končne rezultate smo upoštevali tiste, ki so se ujemali vsaj pri dveh metodah.

Tabela VIII: Primerjava rezultatov določanja protiteles IgG pri metodah Biotrin ELISA, Liaison Biotrin in recomLine imunoblot.

Vzorec	Metoda ELISA Biotrin	Metoda kemiluminiscence Liaison	Metoda <i>recomLine</i> imunoblot	Končni rezultat
1	POZ	NEG	NEG	NEG
2	POZ	NEG	NEG	NEG
3	POZ	NEG	POZ	POZ
4	POZ	NEG	NEG	NEG
5	POZ	NEG	POZ	POZ

V tabeli VIII smo primerjali rezultate, ki smo jih dobili pri testiranju vzorcev za prisotnost specifičnih protiteles IgG z vsemi tremi metodami. S končnim rezultatom so se ujemali 3 rezultati pri metodi Liaison Biotrin in 2 pri metodi Biotrin ELISA.

Tabela IX: Primerjava rezultatov določanja protiteles IgM pri metodah Biotrin ELISA, Liaison Biotrin in recomLine imunoblot.

Vzorec	Metoda ELISA Biotrin	Metoda kemiluminiscence Liaison	Metoda <i>recomLine</i> imunoblot	Končni rezultat
1	NEG	POZ	NEG	NEG
2	NEG	POZ	NEG	NEG
3	NEG	POZ	NEG	NEG
4	NEG	POZ	NEG	NEG
5	NEG	POZ	POZ	POZ

Tabela IX prikazuje rezultate vzorcev pri določanju prisotnosti specifičnih protiteles IgM z vsemi tremi metodami. S končnim rezultatom so se ujemali 4 rezultati metode Biotrin ELISA in 1 rezultat metode Liaison Biotrin.

Z upoštevanjem rezultatov potrditvenega testa imunoblot, smo dobili končno število pozitivnih in negativnih vzorcev pri določanju posameznih specifičnih protiteles proti parvovirusu B19:

- Pravilno pozitivnih rezultatov pri testiranju za specifična protitelesa IgG je bilo 168.
- Pravilno negativnih rezultatov pri testiranju za specifična protitelesa IgG je bilo 73.
- Pravilno pozitivnih rezultatov pri testiranju za specifična protitelesa IgM je bilo 14.
- Pravilno negativnih rezultatov pri testiranju za specifična protitelesa IgM je bilo 227.

4.6 IZRAČUN OBČUTLJIVOSTI IN SPECIFIČNOSTI TESTOV

4.6.1 Biotrin ELISA IgG

$$Občutljivost (\%) = \frac{168}{168 + 0} \times 100\% = 100\%$$

$$Specifičnost (\%) = \frac{73}{73 + 3} \times 100\% = 96\%$$

4.6.2 Metoda kemiluminiscence Liaison Biotrin IgG

$$Občutljivost (\%) = \frac{168}{168 + 2} \times 100\% = 98,8\%$$

$$Specifičnost (\%) = \frac{73}{73 + 0} \times 100\% = 100\%$$

4.6.3 Biotrin ELISA IgM

$$Občutljivost (\%) = \frac{14}{14 + 1} \times 100\% = 93\%$$

$$Specifičnost (\%) = \frac{227}{227 + 0} \times 100\% = 100\%$$

4.6.4 Metoda kemiluminiscence Liaison Biotrin IgM

$$Občutljivost (\%) = \frac{14}{14 + 0} \times 100\% = 100\%$$

$$Specifičnost (\%) = \frac{227}{227 + 4} \times 100\% = 98,3\%$$

5 RAZPRAVA

Parvovirus B19 je majhen virus, ki povzroča peto bolezen pri otrocih. Pogosto je tudi vzrok za okužbe ploda in številnih bolezni pri odraslih (artritis, kronične anemije, aplastične krize) (15).

Okužbe s parvovirusom B19 so zelo pogoste. Načeloma ne predstavljajo posebnih nevarnosti, lahko pa postanejo zelo resne in usodne, zlasti pri nosečnicah in plodu ter imunsko oslabljenih ljudeh. Zato je zelo pomembna pravočasna in natančna diagnostika o prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM proti parvovirusu B19 pri ljudeh s sumom na okužbo (7).

Pri dokazovanju okužb s parvovirusom B19, zlasti nedavno prebolelih, veljajo za standardne serološke metode encimsko imunski testi. Najbolj podobni nativnim virusnim antigenom so proteini, izraženi v bakulovirusih. Metode, ki le te uporabljajo, pa naj bi bile najbolj učinkovite (2).

Po podatkih FDA (US Food and Drug Administration), je imel » μ -capture« encimsko imunski test pri določanju IgM 89,1 % občutljivost ter 99,4 % specifičnost, za določanje IgG pa je bila najuspešnejša imunometoda na mikrotiterskih ploščicah, ki uporablja kapsidne VP2 antigene (3).

Tako naj bi bila metoda ELISA z nedenaturiranimi antigeni najuspešnejša pri določanju specifičnih protiteles IgG proti konformacijskim epitopom. Metoda imunoblot pa naj bi se uporabljala kot potrditveni test za določanje protiteles, ki imajo reaktivnost proti posameznim epitopom (14).

Odločili smo se, da bi ovrednotili nov diagnostični komplet, ki ga je razvil proizvajalec DiaSorin, Biotrin International. Gre za metodo ELISA, ki je prizadena na metodo kemiluminiscence in se v celoti izvaja na aparaturi Liaison. Primerjali smo ga z referenčno metodo ELISA istega proizvajalca.

Pri določanju IgG smo ugotovili 98 % ujemanje med metodama, 2 % rezultatov je bilo neskladnih. Metoda ELISA je dala več pozitivnih rezultatov.

Tudi pri določanju IgM smo ugotovili 98 % ujemanje in 2 % neujemanje rezultatov. V tem primeru je imela metoda kemiluminiscence več pozitivnih rezultatov.

Pri neskladnih rezultatih smo z recomLine imunoblot testom ugotovili, da je imela metoda kemiluminiscence 2 lažno negativna rezultata pri določanju specifičnih protiteles IgG ter 4

lažno pozitivne rezultate pri določanju specifičnih protiteles IgM. Metoda ELISA pa je dala 3 lažno pozitivne rezultate pri določanju specifičnih protiteles IgG, pri določanju specifičnih protiteles IgM pa enega lažno negativnega.

V študiji na Univerzi v Pittsburghu so ocenjevali uspešnost treh metod ELISA različnih proizvajalcev, ki uporabljajo enega ali več konformacijskih epitopov za dokazovanje specifičnih protiteles proti parvovirusu B19. Kot potrditveni test so uporabili imunofluorescenčno metodo Biotrin. Najvišji odstotek skladnih rezultatov s končnimi rezultati so ugotovili pri testu proizvajalca Biotrin International, ki uporablja konformacijske VP2 epitope izražene v bakulovirusu. Dokazali so 100 % ujemanje pri določanju specifičnih protiteles IgM in 99,5 % ujemanje pri določanju specifičnih protiteles IgG, nezanesljiv rezultat je bil samo eden. Pri rezultatih, ki so bili neskladni, je imela Biotrin ELISA zopet najboljše ujemanje, in sicer 100 % pri določanju specifičnih protiteles IgM in 86 % pri določanju specifičnih protiteles IgG. Po besedah avtorjev članka, naj bi na splošno ta test imel zelo malo nezanesljivih rezultatov, tudi lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov v tej študiji ni bilo (7).

Iz rezultatov, ki smo jih dobili, smo izračunali 100 % občutljivost in 96 % specifičnost metode Biotrin ELISA pri določanju specifičnih protiteles IgG ter 93 % občutljivost in 100 % specifičnost pri določanju specifičnih protiteles IgM. Metoda Liaison Biotrin je imela 98,8 % občutljivost in 100 % specifičnost pri določanju specifičnih protiteles IgG ter 100 % občutljivost in 98,2 % specifičnost pri določanju specifičnih protiteles IgM.

Proizvajalec obeh testov DiaSorin, Biotrin International je opravil podobno študijo, v kateri so primerjali metodo Liaison z referenčno metodo ELISA. Pri testiranju 965 vzorcev za prisotnost specifičnih protiteles IgG so ugotovili več kot 99 % ujemanje. Metodi Liaison so določili 99,1 % specifičnost in 99,5 % občutljivost (9). Pri dokazovanju prisotnosti specifičnih protiteles IgM v 974 vzorcih, so ugotovili 98 % ujemanje med metodama. Metodi Liaison pa so določili 93 % občutljivost in 99,2 % specifičnost. Testirali so še vzorce s potrjeno parvovirusno okužbo, kjer so ugotovili 100 % ujemanje med metodama (10).

Naši podatki in podatki proizvajalca so si precej podobni, kar pomeni, da sta obe metodi primerni in zanesljivi za diagnostiko okužb s parvovirusom B19.

Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG ima sicer višjo občutljivost Biotrin ELISA, kar pomeni, da prepozna manjše količine prisotnih protiteles kot metoda Liaison Biotrin, ima pa manjšo specifičnost in zato lahko daje lažno pozitivne rezultate.

Pri določanju protiteles IgM ima večjo občutljivost metoda Liaison Biotrin in tako hitreje prepozna prisotna protitelesa, vendar je zaradi manjše specifičnosti večja možnost lažno pozitivnih rezultatov, ker lahko zazna tudi druga protitelesa.

Lažno pozitivni rezultati za protitelesa IgM in lažno negativni rezultati za protitelesa IgG lahko negativno vplivajo na obravnavo bolnika. To se odraža v ponavljanju seroloških preiskav, dodatnih obiskih pacientov, ponovnih odvzemih vzorcev krvi in podobno.

Test, ki ima manj nezanesljivih in nepravnih rezultatov je tako stroškovno bolj učinkovit in dobrodošel (7).

Menimo, da bi nov diagnostični komplet Liaison Biotrin pri diagnostiki okužb s parvovirusom B19 lahko zamenjal že obstoječo metodo Biotrin ELISA v laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Metoda Biotrin ELISA se izvaja ročno in lahko hitro pride do napak. Metoda Liaison Biotrin ima veliko prednost, ker je avtomatizirana ter zato hitrejša, enostavnejša in cenejša. Tudi rezultati testiranja so na voljo že v istem dnevu.

6 SKLEP

- V diplomski nalogi smo želeli ovrednotiti novo metodo Liaison Biotrin za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM proti parvovirusu B19, ki temelji na metodi kemiluminiscence. Primerjali smo jo z metodo ELISA istega proizvajalca.
- Pregledali smo 251 serumskih vzorcev, odvzetih v letu 2009.
- Ugotovili smo 98 % ujemanje rezultatov obeh metod pri testiranju za specifična protiteesa IgG. Prav tako je bilo ujemanje rezultatov pri testiranju za prisotnost specifičnih protiteles IgM 98 %.
- S potrditvenim testom *recomLine imunoblot* smo ugotovili 3 lažno pozitivne rezultate metode Biotrin ELISA ter 2 lažno negativna rezultata metode Liaison Biotrin pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG. Pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM smo ugotovili 1 lažno negativen rezultat z metodo Biotrin ELISA in 4 lažno pozitivne rezultate z metodo Liaison Biotrin.
- Metoda Biotrin ELISA je imela 100 % občutljivost in 96 % specifičnost pri dokazovanju prisotnosti specifičnih protiteles IgG ter 93 % občutljivost in 100 % specifičnost pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM. Metoda Liaison Biotrin pa je imela 98,8 % občutljivost in 100 % specifičnost pri dokazovanju specifičnih protiteles IgG ter 100 % občutljivost in 98,2 % specifičnost pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM.
- Obe metodi imata ustrezno občutljivost in specifičnost v primerjavi z raziskavo proizvajalca testov DiaSorin, Biotrin International. Zaradi dobrega ujemanja sta primerni in zanesljivi za ugotavljanje okužb s parvovirusom B19.

7 LITERATURA

- (1) Young NS, Brown KE: Mechanisms of disease Parvovirus B19. N Engl J Med 2004; 350: 586-97
- (2) Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD: Principles and Practice of Clinical Virology, Fifth Edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 2004: 703-20
- (3) Corcoran A, Doyle S: Advances in the biology, diagnosis and host – pathogen interactions of parvovirus B19. J Med Microbiol 2004; 53: 459-75
- (4) Marolt–Gomišček M, Radšel–Medvešček A: Infekcijske bolezni, Tangram, Ljubljana, 2002: 412-15
- (5) Petrovec M. Okužbe s parvovirusom B19 v nosečnosti. Medicinski razgledi 2006; 45: Suppl 3: 133-8.
- (6) Brown KE: Detection and quantitation of parvovirus B19. J Clin Virol 2004; 31: 1-4
- (7) Butchko AR, Jordan JA: Comparison of Three Commercially Available Serologic Assays Used To Detect Human Parvovirus B19-Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies in Sera of Pregnant Women. J Clin Microbiol July 2004; 42: 3191-95
- (8) http://drnabong.blogspot.com/2009_01_01_archive.html (10. 5. 2010)
- (9) LIAISON Biotrin Parvovirus B19 IgG; Instructions for use. Biotrin International Ltd., Dublin, Irska, 2010
- (10) LIAISON Biotrin Parvovirus B19 IgM; Instructions for use. Biotrin International Ltd., Dublin, Irska, 2009

- (11) Biotrin Parvovirus B19 IgG Enzyme Immunoassay; Instructions for use. Biotrin International Ltd., Dublin, Irska, kataloška številka: V519IG
- (12) Biotrin Parvovirus B19 IgM Enzyme Immunoassay; Instructions for use. Biotrin International Ltd., Dublin, Irska, kataloška številka: V619IM
- (13) *recomLine Parvovirus B19 IgG [avidnost] / IgM*; Instructions for use. Mikrogen Diagnostik, Neuried, Nemčija, 2007
- (14) Manaresi E, Gallinella G, Venturoli S, Zerbini M, Musiani M: Detection of parvovirus B19 IgG: choice of antigens and serological tests. J Clin Virol 2004; 29: 51-53
- (15) Coon D: Parvovirus B19: Characteristics, Diseases, and Diagnosis. Clin Microbiol Newsletter 2003; 25: 161-67

PRILOGE

Priloga A: Seznam 241 serumskih vzorcev, odvzetih v letu 2009, ki smo jih testirali z metodama Liaison Biotrin in Biotrin ELISA za prisotnost specifičnih protiteles IgG in IgM proti parvovirusu B19.

Vzorec	Starost	Spol	Metoda ELISA Biotrin IgG	Metoda ELISA Biotrin IgM	Metoda kemi- luminiscence Liaison IgG	Metoda kemi- luminiscence Liaison IgM
1	33	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
2	75	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
3	43	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
4	24	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
5	42	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
6	7	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
7	7	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
8	39	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
9	30	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
10	26	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
11	2	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
12	33	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
13	21	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
14	42	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
15	33	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
16	17	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
17	7	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
18	35	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
19	59	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
20	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
21	46	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
22	37	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
23	8	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
24	26	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
25	58	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
26	4	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
27	28	moški	NEG	NEG	NEG	NEG

28	2	moški	POZ	NEG	NEG	NEG
29	2	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
30	11	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
31	4	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
32	6	ženski	POZ	NEG	NEG	NEG
33	23	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
34	9	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
35	4	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
36	1	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
37	4	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
38	1	ženski	NEG	NEG	NEG	POZ
39	3	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
40	34	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
41	29	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
42	32	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
43	7	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
44	17	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
45	26	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
46	1	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
47	57	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
48	41	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
49	32	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
50	5	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
51	27	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
52	23	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
53	33	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
54	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
55	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
56	37	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
57	41	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
58	13	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
59	8	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
60	2	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
61	39	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
62	4	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
63	2	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG

64	44	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
65	3	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
66	34	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
67	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
68	36	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
69	2	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
70	44	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
71	19	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
72	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
73	34	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
74	12	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
75	33	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
76	26	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
77	56	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
78	28	ženski	POZ	NEG	NEG	NEG
79	30	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
80	36	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
81	24	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
82	41	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
83	58	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
84	25	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
85	21	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
86	58	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
87	23	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
88	51	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
89	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
90	30	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
91	55	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
92	29	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
93	48	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
94	76	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
95	25	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
96	15	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
97	38	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
98	27	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
99	1	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG

100	40	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
101	39	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
102	57	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
103	55	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
104	48	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
105	33	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
106	27	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
107	56	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
108	4	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
109	29	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
110	38	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
111	26	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
112	2	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
113	4	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
114	9	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
115	26	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
116	5	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
117	33	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
118	1	ženski	NEG	NEG	NEG	POZ
119	2	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
120	52	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
121	59	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
122	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
123	32	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
124	9	moški	POZ	POZ	POZ	POZ
125	36	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
126	11	moški	POZ	NEG	POZ	POZ
127	29	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
128	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
129	57	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
130	24	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
131	41	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
132	41	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
133	39	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
134	21	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
135	29	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG

136	37	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
137	28	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
138	57	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
139	18	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
140	35	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
141	15	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
142	23	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
143	14	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
144	24	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
145	32	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
146	43	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
147	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
148	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
149	53	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
150	25	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
151	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
152	21	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
153	23	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
154	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
155	20	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
156	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
157	2	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
158	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
159	3	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
160	51	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
161	34	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
162	28	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
163	38	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
164	5	moški	POZ	NEG	NEG	NEG
165	47	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
166	25	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
167	54	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
168	37	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
169	3	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
170	10	moški	POZ	MV	POZ	POZ
171	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG

172	3	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
173	26	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
174	37	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
175	35	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
176	2	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
177	76	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
178	57	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
179	29	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
180	39	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
181	18	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
182	16	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
183	43	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
184	5	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
185	28	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
186	32	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
187	8	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
188	4	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
189	20	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
190	43	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
191	19	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
192	1	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
193	26	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
194	54	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
195	42	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
196	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
197	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
198	9	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
199	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
200	32	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
201	64	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
202	3	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
203	59	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
204	69	ženski	POZ	NEG	NEG	NEG
205	31	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
206	62	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
207	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG

208	36	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
209	60	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
210	49	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
211	3	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
212	12	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
213	17	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
214	30	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
215	73	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
216	4	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
217	53	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
218	32	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
219	13	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
220	28	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
221	51	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
222	34	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
223	3	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
224	2	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
225	17	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
226	38	moški	POZ	NEG	POZ	POZ
227	47	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
228	8	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
229	34	ženski	NEG	NEG	NEG	NEG
230	11	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
231	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
232	41	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
233	51	ženski	POZ	POZ	POZ	POZ
234	38	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
235	44	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
236	1	moški	NEG	NEG	NEG	NEG
237	25	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
238	3	moški	POZ	NEG	POZ	NEG
239	33	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
240	32	ženski	POZ	NEG	POZ	NEG
241	16	moški	POZ	NEG	POZ	NEG

Auswertebogen
Evaluation form

MIKROGEN

molekularbiologische Entwicklungs-GmbH

Datum:

Date

Bearbeiter:

Testing person

Röhrchen-Nr.:

Tube No.

Färbezeit:

Time of dyeing

Florianshofen 2-4
D-82061 Neuried

Tel. +49 (0)89 54 80 1-00

Fax +49 (0)89 54 80 1-100

Chargen-Nr.:

Charge No.

Antikörper-Klasse:

Antibody class

recomLine Parvovirus B19		Erkannte Banden					Beurteilung						
Strip-Nr.	Probe	Str.-Nr. Strip No.	Art.Nr. Art.No.	IgG	IgM	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Antigen bands	Interpretation
1		1	LPA 01										
2		2	LPA 02										
3		3	LPA 03										
4		4	LPA 04										
5		5	LPA 05										
6		6	LPA 06										
7		7	LPA 07										
8		8	LPA 08										
9		9	LPA 09										
10		10	LPA 10										
11		11											
12		12											
13		13											
14		14											
15		15											
16		16											
17		17											
18		18											
19		19											
20		20											