

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAŠA MERJAK

**PRIMERJAVA TREH METOD ZA DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH
PROTITELESIGG PROTI VIRUSU VARICELA ZOSTER**

**COMPARISON OF THREE METHODS FOR DETECTION OF SPECIFIC
ANTIBODIESIGG AGAINST VARICELLA ZOSTER VIRUS**

Ljubljana, 2011

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

Zahvala

Prisrčna hvala mojemu mentorju, doc. dr. Miroslavu Petrovcu, za strokovno pomoč in vodenje v času pisanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo za pomoč pri praktičnem delu diplomske naloge.

Izjava

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

Kazalo

1. UVOD	1
1.1 POIMENOVANJE IN ZGRADBA VZV	1
1.2 EPIDEMIOLOGIJA VZV	2
1.3 PATOGENEZA VZV	2
1.4 KLINIČNI ZNAKI	3
1.5 OKUŽBA Z VZV V NOSEČNOSTI	4
1.5.1 SINDROM KONGENITALNE VARICELLE	4
1.5.2 PLJUČNICA ZARADI OKUŽBE Z VIRUSOM VARICELLA ZOSTER	5
1.5.3 NEONATALNE NORICE	5
1.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VZV	6
1.6.1 NEPOSREDEN DOKAZ VZV	6
1.6.2 POSREDEN DOKAZ VZV	8
1.7 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z VZV	9
1.8 PREPREČEVANJE OKUŽB Z VZV	10
1.8.1 CEPLJENJE	11
1.8.2 PASIVNA ZAŠČITA Z IMUNOGLOBULINI	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIAL IN METODE	14
3.1 VZORCI	14
3.2 METODE	14
3.2.1 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA LIAISON	14
3.2.2 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA SIEMENS.....	16
3.2.3 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA VIDAS	19
4. REZULTATI	22
4.1 REZULTATI PREISKAV	22
4.2 UJEMANJE REZULTATOV	23
4.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	25
4.3.1 PRIMERJAVA REZULTATOV MED ANALIZNIMA POSTOPKOMA PROIZVAJALCEV SIEMENS IN LIAISON	26
4.3.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MED ANALIZNIMA POSTOPKOMA PROIZVAJALCEV SIEMENS IN VIDAS	27
4.4 MEJNI REZULTATI	28
5. RAZPRAVA	28
6. SKLEP	32
7. LITERATURA	33

Kazalo slik

Slika 1: Shema zgradbe VZV.....	1
Slika 2: Kožne spremembe pri noricah	3
Slika 3: Princip kemiluminiscenčnega testa.....	15
Slika 4: Princip encimsko imunskega testa.....	17
Slika 5: Princip encimsko fluorescenčnega testa.....	19
Slika 6: Kartuša z reagenti in nastavek.....	20
Slika 7: Ujemanje pozitivnih rezultatov testiranja s tremi različnimi analiznimi postopki	23
Slika 8: Ujemanje negativnih rezultatov testiranja s tremi različnimi analiznimi postopki	24

Kazalo preglednic

Preglednica I: Kriteriji za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje.....	18
Preglednica II: Mejne vrednosti in interpretacija rezultatov analiznega postopka proizvajalca Vidas.....	22
Preglednica III: Struktura vzorca glede uporabljenega analiznega postopka.....	22
Preglednica IV: Termini za izračun občutljivosti in specifičnosti testov	25
Preglednica V: Primerjava rezultatov dveh analiznih postopkov proizvajalcev Siemens in Liaison.....	26
Preglednica VI: Primerjava rezultatov dveh analiznih postopkov proizvajalcev Siemens in Vidas.....	27

POVZETEK

Virus varicella zoster pri otrocih povzroča bolezen noric, pri reaktivaciji virusa pa govorimo o pasavcu. Čeprav je okužba z virusom varicella zoster v nosečnosti redka, lahko povzroča hude bolezni pri materi in novorojenčku. Določitev imunskega statusa nosečnic brez anamneze o noricah je pomembna zaradi ukrepanja z imunoglobulini varicella zoster pri nosečnicah brez specifičnih protiteles. Testiranje imunskega statusa zahteva visoko občutljive in specifične teste za pravočasno in natančno dokazovanje specifičnih protiteles IgG proti virusu varicella zoster.

V diplomskem delu smo primerjali dva analizna postopka proizvajalcev Liaison in Vidas z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens za dokaz specifičnih protiteles IgG proti virusu varicelle zoster. Raziskava je pokazala, da sta občutljivost in specifičnost analiznega postopka proizvajalca Liaison v primerjavi z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens 98,6 % in 100 %, za analizni postopek proizvajalca Vidas v primerjavi z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens pa 88,9 % in 100 %. Ujemanje med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison je znašalo 98,3 %, med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Vidas pa 89,2 %. Ugotovili smo, da serumi z mejno vrednostjo dobljeni z analiznim postopkom proizvajalca Vidas, z analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison zelo pogosto že vsebujejo zadostno količino protiteles, ki so prisotna v taki količini, da jih opredelimo kot zaščitna.

Dokazali smo, da je analizni postopek proizvajalca Liaison primeren za zaznavanje okužb z virusom varicelle zoster. Slabše rezultate smo dobili za analizni postopek proizvajalca Vidas, ki je nekoliko manj občutljiv kot analizni postopek proizvajalca Liaison in ima morda previsoko nastavljeno mejno vrednost testa.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test
EM	elektronska mikroskopija
FAMA	fluorescentna protitelesa proti membranam
HHV	človeški herpesvirus
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFV	relativna vrednost fluorescence
RLU	relativne svetlobne enote
RNA	ribonukleinska kislina
TRFIA	časovno rešen imunsko fluorescenčni test
VZIG	imunoglobulin varicella zoster
VZV	virus varicella zoster

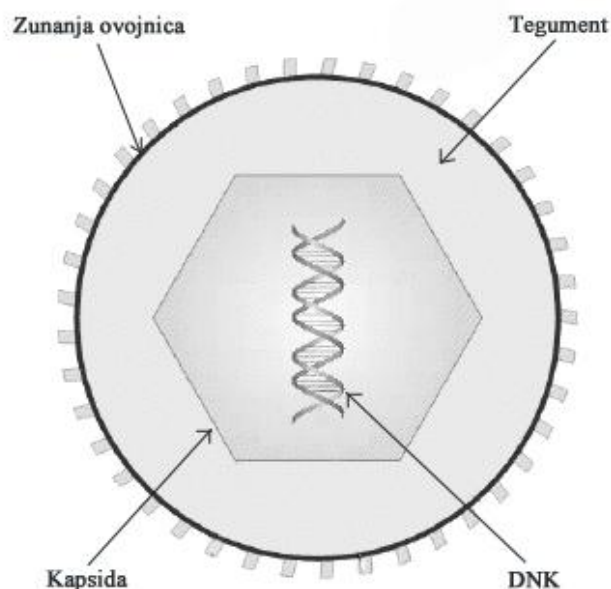
1. UVOD

1.1 POIMENOVANJE IN ZGRADBA VZV

Herpesvirusi so dobili ime po grški besedi »herpein«, ki pomeni plaziti se. V naravi so herpesvirusi zelo razširjeni in več kot 100 jih je bilo osamljenih iz različnih gostiteljev kot so sesalci, ptice, ribe, plazilci, dvoživke in mehkužci (1).

Danes poznamo osem človeških herpesvirusov: virus herpes simplex tip 1 in 2, virus varicella zoster, virus Epstein-Barr, citomegalovirus, človeški herpesvirus tip 6, človeški herpesvirus tip 7 in človeški herpesvirus tip 8, ki ga imenujemo tudi virus Kaposijevega sarkoma. Ti virusi so si po lastnostnih in učinkih na celice zelo različni (2).

Virus varicella zoster (VZV), znan kot človeški herpesvirus 3 (HHV - 3), spada v družino *Herpesviridae*, poddružino *Alphaherpesvirinae* in rod *Varicellovirus*. Virion je sestavljen iz štirih različnih enot: zunanje ovojnice, tegumenta, kapside (ikozahedralna) in sredice z genom (3). Genom je linearna molekula dvovijačne DNA iz 125 kbp, v premeru pa meri virus 150 do 200 nm (4). Spodnja slika prikazuje enote, iz katerih je virus sestavljen.



Slika 1: Shema zgradbe VZV

1.2 EPIDEMIOLOGIJA VZV

VZV povzroča po vsem svetu zelo razširjeno bolezen, in sicer norice. V starosti do 7 let preboli norice več kot 68 % ljudi, do 15. leta še dodatno 25 %, kar pomeni, da do svojega 15. rojstnega dne 95 % populacije pridobi imunost. (5) Pri nas po 20. letu preboli norice le še približno 4 % ljudi, kar pomeni, da preostaneta še 2 % za ženske v rodni dobi. V skladu s tem je razumljivo, da je okužba v nosečnosti redka, a nikakor ne nenevarna. Incidenca okužbe z noricami v nosečnosti je 0,8 do 7 na 10.000 nosečnic, prenos virusa na plod je približno 26 % (6).

Edini znani gostitelj in izvor okužbe je človek. Največ primerov bolezni zasledimo v poznih zimskih mesecih in zgodnjih spomladanskih mesecih. Raziskovalci so ugotovili, da bolezen enako prizadene oba spola in da o njej poročajo pri vseh rasah (7).

1.3 PATOGENEZA VZV

Okužba se prenaša s človeka na človeka z neposrednim stikom z bolezenskimi spremembami na koži pri noricah ali pasavcu ali z vdihavanjem okuženih kapljic. Kongenitalna okužba se pojavi kot rezultat potovanja virusa preko placente med materinim obdobjem viremije (7).

VZV vstopi kot virus v gostitelja skozi sluznico dihal ali očesno veznico. Številni virusni glikoproteini sodelujejo pri lepljenju na celice sluznice in omogočajo virusu vstop in razširitev od celice do celice. Ti glikoproteini tudi spodbujajo gostiteljev imunski odziv. VZV se pomnožuje v bezgavkah 4–6 dni, preden se pojavi prva viremija. Med viremijo se virus razširi v notranje organe (jetra, vranica in drugi organi). Virus se nato dalje pomnožuje v retikuloendotelijskem tkivu. Sekundarna viremija se pojavi približno 14. dan po okužbi (med 10. in 21. dnem). Ta viremija pospeši, da se virus razširi po površini nosnega dela žrela in koži ter povzroči nastanek tipičnega makulopapularnega mehurčkastega izpuščaja. Izpuščaj se pojavi v roku 14–16 dni po okužbi. Razvija se 3–7 dni in nastaja v več stopnjah od papule, mehurčka, pustule in nazadnje kraste. Mehurčki vsebujejo velike količine virusa in predstavljajo najpomembnejšo pot prenosa virusa. Latenca je vzpostavljena, ko se virus prenese v dorzalne korenine ganglija (8, 9).

Inkubacija traja od 10 do 21 dni, povprečno 14 do 16 dni. Inkubacijska doba je krajša pri imunsko oslabljenih posameznikih in daljša pri tistih, ki so prejeli imunoglobuline. Kužnost se pojavi v maksimalno 24 do 48 urah, preden se pojavi izpuščaj, in traja, dokler vsi mehurčki ne preidejo v kraste (7).

VZV ostane po prebolelih noricah prisoten vse življenje v senzornih ganglijih. Pri približno 15 % ljudi se VZV reaktivira, kar se klinično odrazi kot herpes zoster (pasavec). VZV povzroči vnetje živcev in kože, kjer se pojavijo boleče, mehurčkaste spremembe. Vzrok reaktiviranja ni jasen, morda je posledica oslABLJENE celično posredovane imunosti, staranja imunskega sistema, okužbe z VZV intrauterino, poškodbe, stresa, ultravijoličnih žarkov. Še najbolj jasna povezanost se izkazuje med oslABLJENIM celičnim imunskim sistemom in pojavom pasavca, saj je po 65. letu starosti največ obolelih (10).

1.4 KLINIČNI ZNAKI

Pri otrocih se bolezen začne s prodromi, ki vključujejo slabo počutje in nekoliko zvišano temperaturo. Ti simptomi trajajo 1 do 2 dni, nato se pojavi izpuščaj. Kožne spremembe se začnejo kot makule rožnate barve in hitro napredujejo v papule in mehurčke. Mehurček se nato v sredi vdre, nastane pustula in nazadnje krasta. Kožni izpuščaji močno srbijo (7) in jih lahko vidimo na sliki 2.



Slika 2: *Kožne spremembe pri noricah*

Kožne spremembe so razporejene tipično centralno, z največjo zgoščenostjo na trupu. Izpuščaji na obrazu in lasišču so tudi pogosti, šele kasneje pa se pojavijo tudi na udih. Dlanem in stopalom je pogosto prizaneseno in so brez izpuščajev. Sluznične membrane so

pogosto prizadete. Kožne spremembe na sluznici ust ali nožnice hitro postanejo razmehčane in tvorijo plitve in boleče razjede. Izpuščaji se pojavljajo v zagonih vsak dan ali vsak drugi dan, z dva do štiri vzbrstmi, ki se razvijajo tekom bolezni. Značilno je, da so izpuščaji v različnih razvojnih stopnjah prisotni skozi celoten prvi teden bolezni. Nove zagone spremlja dvig temperature oziroma vročina traja toliko časa, dokler se pojavljajo nove vzbrsti. Tipičen mehurček je ovalen, velik 2 do 3 mm, z daljšo osjo v smeri kožnih gub. Povprečno število mehurčkov je med 250 in 500. Kožne spremembe so površinske in po 1–2 tednih kraste odpadejo. Pogosto ta mesta nekaj mesecev ostanejo bolj pigmentirana ali pa nastane trajna brazgotina (8, 11).

Pri odraslih je potek noric težji kot pri otrocih. Bolezen je pogosto povezana z resnimi prodromalnimi simptomi, kot so razdražljivost, glavoboli, neješčost, bolečine v sklepih in mišicah ter višja in dalj trajajoča telesna temperatura. Izpuščaj je gostejši in izginja počasneje, pogostejše je tudi tveganje za zaplete (8,11).

1.5 OKUŽBA Z VZV V NOSEČNOSTI

Okužba med nosečnostjo predstavlja posebno stanje, ker sta ogrožena dva bolnika– mati in plod. Čeprav so norice v nosečnosti redke (1-7 na 10.000 nosečnic), lahko škodujejo materi in novorojenčku. Kadarkoli med nosečnostjo lahko norice povzročijo znotrajmaternično okužbo. Posledice za plod so odvisne od obdobja v nosečnosti, ko pride do primarne okužbe (12). Takšna obdobja so tri, in sicer v prvih dveh trimesečjih nosečnosti je bolj ogrožen plod zaradi sindroma kongenitalne varicelle; v tretjem trimesečju je ogrožena predvsem mati zaradi hude pljučnice; tik pred porodom in po njem pa zopet novorojenček zaradi neonatalnih noric. Zato je pri nosečnici pomembno, da čimprej po stiku z nalezljivo boleznijo, ki ogroža nosečnico ali plod, ugotovimo njeno dovzetnost za okužbo ter ustrezno ukrepamo (13).

1.5.1 SINDROM KONGENITALNE VARICELLE

Prvi primer sindroma kongenitalne varicelle sta opisala Laforet in Lynch leta 1947. Značilni simptomi so zmanjšana porodna teža, kožne spremembe z brazgotinjenjem, nevrološke okvare, bolezni oči in skeletne anomalije (14). Okužba v zgodnji nosečnosti

lahko povzroči hujše poškodbe ali mrtvorojenost, saj so zarodkovi organi še v fazi razvoja (15). Tveganje za sindrom kongenitalne varicelle je 0,4 % do 12. tedna nosečnosti (prvo trimesečje) in 2,0 % med 13. in 20. tednom (drugo trimesečje) (16). Po 20. tednu nosečnosti praviloma ne pričakujemo več sindroma kongenitalne varicelle. Skoraj 30% novorojenčkov s sindromom kongenitalne varicelle umre v prvih mesecih življenja (13).

Kriteriji za določitev diagnoze sindroma kongenitalne varicelle so trije (17):

1. pojav noric pri materi med nosečnostjo
2. kongenitalne spremembe na koži v obliki dermatomske razporeditve in/ali nevrološke okvare, spremembe na očeh in hipoplazija udov
3. potrditev znotrajmaternične VZV okužbe pri otroku z:
 - dokazom virusne DNA pri otroku s PCR
 - prisotnostjo specifičnih protiteles IgM
 - perzistenco protiteles IgG po 7. mesecu življenja
 - pojavom pasavca v zgodnjem otroštvu

1.5.2 PLJUČNICA ZARADI OKUŽBE Z VIRUSOM VARICELLA ZOSTER

Bolezen se pojavlja bolj pogosto v tretjem trimesečju. Klinični potek bolezni je nepredvidljiv in lahko hitro napreduje do hipoksije in smrtno nevarne odpovedi dihal. V primerjavi z drugimi odraslimi bolniki je pljučnica v nosečnosti bolj huda bolezen, vendar ne pogostejša (13). Brez protivirusnega zdravljenja lahko smrtnost doseže 40 % (16). Če je nosečnica zdravljena, je smrtnost manjša, a še vedno 3 do 14 % (18).

1.5.3 NEONATALNE NORICE

Neonatalne norice je mogoče pričakovati 1 do 16 dni po rojstvu, če je mati zbolela v zadnjih treh tednih nosečnosti. Potek bolezni je v tem obdobju praviloma lahek, saj se 5 do 6 dni po izbruhu noric v materini krvi pojavijo zaščitna protitelesa, ki se preko posteljice prenesejo na plod (14).

Zelo huda in smrtno nevarna oblika neonatalnih noric se pojavi, če mati zboli za noricami 4–5 dni pred porodom ali 2 dni po porodu. Otrok se rodi brez materinih protiteles in zboli med 5. in 10. dnem po rojstvu. Poleg značilnega kožnega izpuščaja ima novorojenček

težko dihalno stisko ter znake prizadetosti osrednjega živčevja in drugih notranjih organov. Smrtnost je 20 % (16, 17).

1.6 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VZV

V večini primerov določimo klinično diagnozo noric glede na značilnosti vezikularnega izpuščaja. Laboratorijsko testiranje najpogosteje uporabljamo v primeru hudih ali netipičnih bolezni in v času nosečnosti, ko ni podatkov o prebolelih noricah ali ko se pri nosečnici razvije klinična slika noric ali pasavca. VZV lahko dokazujemo s posrednimi (serološkimi) ali neposrednimi metodami.

Za laboratorijsko potrditev noric so pomembni predvsem vzorci iz vezikularne tekočine in kožnih sprememb. Vzorci krvi za serološke preiskave so bolj primerni za testiranje imunskega statusa. Vzorci, kot so izločki nosnega dela žrela, slina, urin, bronhialni izpirek in likvor so manj primerni, ker je manj verjetno, da bi v teh kužninah dokazali virus (19).

1.6.1 NEPOSREDEN DOKAZ VZV

Laboratorijska diagnostika sloni na neposrednem dokazu virusa v kužnini, na določitvi virusnih antigenov in virusnih nukleinskih kislin. Nadalje lahko opravimo Tzanckov test ali virus opazujemo pod elektronskim mikroskopom.

Tzanckov razmaz

Tzanckov razmaz izvedemo tako, da postrgamo izpuščaje in jih nato pobarvamo po Giemsi z hematoksilin-eozinom ali po Papanicolau. V razmazu lahko opazimo večjedralne celice velikanke, ki vsebujejo nuklearne vključke (7). Te so odsotne v neherpetičnih veziklih (20). Tzanckov razmaz je hiter in uporaben test za potrditev okužbe z α -herpesvirusi, vendar je slabo specifičen, ker ne razlikuje med VZV in HSV. Specifičnost testa lahko povečamo z imunohistokemijskimi barvanji (7, 8).

Izolacija virusa

Ko želimo virus osamiti v akutnem obdobju okužbe, moramo material odvzeti čim prej, saj je najvišja koncentracija virusa prisotna že ob pojavu prvih bolezenskih znakov. Ker so

virusi zunaj gostitelja zelo občutljivi na vplive okolja, vzorce prenesemo v laboratorij v transportnem gojišču v najkrajšem možnem času. (21) Virus varicella zoster je možno izolirati iz vezikularne tekočine s pomočjo celičnih kultur v roku 3–7 dni, čeprav se citopatski učinki včasih razvijejo tudi počasneje. VZV je v tekočini mehurčka zelo nestabilen in je potrebno kužnino takoj inokulirati v enega izmed sistemov za razmnoževanje virusov, in sicer v celične kulture (20). Virus v celični kulturi raste počasi in rezultat dobimo razmeroma pozno (po nekaj dneh ali tednih). Občutljivost diagnostične metode je omejena in zelo odvisna od kakovosti tekočine iz mehurčka, časa obravnave in stopnje kožnih sprememb (22).

Verižna reakcija s polimerazo

Metoda se uporablja za dokazovanje prisotnosti virusov. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda pomnoževanja delcev nukleinskih kislin, in sicer deoksiribonukleinskih kislin. Če želimo pomnožiti RNA, jo moramo prej prepisati v komplementarno DNA z reverzibilno transkriptazo. Metoda PCR je specifična, občutljiva in hitra, saj v nekaj urah pomnožimo odsek virusne DNA več kot milijonkrat. PCR sestavlja od 25 do 40 zaporednih ponovitev temperaturnega ciklusa; vsak cikel pa ima tri stopnje (23):

1. denaturacija dvovijačne DNA pri temperaturi 90–95°C
2. vezava začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50–60°C
3. izgrajevanje komplementarne verige z termostabilno DNA-polimerazo pri 72°C

Dokaz virusnih antigenov

Virusne antigene dokazujemo s specifičnimi protitelesi z različnimi metodami. Najpogosteje uporabljena je metoda imunofluorescence, ki je lahko posredna ali neposredna. Metoda je primerna tudi takrat, ko kužnina po odvzemu ni bila pravilno shranjena. Rezultat preiskave je na voljo v nekaj urah. Za dokaz virusnih antigenov VZV uporabimo metodo direktne imunofluorescence (DIF), ker imamo na voljo označena virusna specifična monoklonska protitelesa. Vzorcju dodamo specifična protitelesa konjugirana s fluorokromom. Nastali kompleks (med antigenom VZV in s fluorokromi označenimi protitelesi) po vzdraženju s svetlobo kratke valovne dolžine oddaja svetlobo daljše valovne dolžine v vidnem spektru. Učinek opazimo z mikroskopom kot fluorescenco (24).

Opazovanje virusov z elektronskim mikroskopom

Nekateri virusi imajo zelo značilno zgradbo in jih lahko na podlagi njihovih morfoloških posebnosti uvrstimo v določeno družino. Elektronsko mikroskopijo (EM) kot neposredno diagnostično metodo uporabimo, kadar dobimo klinični material, v katerem je veliko število virusov; v 1 ml kužnine naj bi bilo vsaj 10^7 delcev. To je največja omejitev elektronske mikroskopije, saj je metoda slabo občutljiva. Pri VZV v tekočini vezikularnih sprememb se navadno nahaja zadostno število delcev. Z EM ne moremo določiti virusa VZV, ampak le družino herpesvirusov (25, 21).

Izboljšava elektronske mikroskopije je imunska elektronska mikroskopija (IEM), ki zagotavlja hitro diagnozo v dveh urah. Metoda lahko razlikuje med VZV in herpes simplex virusom. Vzorcju, v katerem želimo dokazati VZV, dodamo specifičen imunski serum. Če so virusi prisotni, jih protitelesa povežejo v grozdaste skupke, ki jih laže zaznamo (26).

1.6.2 POSREDEN DOKAZ VZV

Virusi izzovejo v gostitelju specifični protitelesni imunski odziv, zato je možno okužbe z virusi dokazovati tudi posredno z ugotavljanjem protiteles v serumu bolnika. Metode posrednega dokazovanja virusov, ki jih imenujemo tudi serološke metode, uporabljamo v glavnem za določanje imunskega statusa pri okužbah z virusi, ki jih ni mogoče gojiti na kulturah celic, ali jih kako drugače neposredno dokazati. Z njimi lahko tudi potrdimo laboratorijsko diagnozo, ki smo jo postavili z neposredno metodo. Prednosti seroloških metod sta enostavnost, nizka cena in možnost avtomatizacije (27).

Po okužbi z virusom VZV se v serumu najprej pojavijo protitelesa IgM, nato šele IgG, ki dosežejo najvišjo raven po treh do štirih tednih. Protitelesa IgM nastajajo le nekaj mesecev, IgG pa se ohranjajo v serumu zelo dolgo, tudi vse življenje. Pri posrednem dokazovanju sveže ali nedavne okužbe je pomembno, kdaj je bil serum odvzet. Za smotrno diagnostično delo potrebujemo dva seruma - parna. Akutnega vzamemo na začetku bolezni, ko opazimo prve bolezenske znake. Drugega, rekonvalescentnega pa dva do tri tedne kasneje.

S serološkimi metodami ugotavljamo, ali je bil bolnik v preteklosti okužen z virusom. Ker so protitelesa IgG v serumu prisotna dolgo časa po okužbi, dokazuje pozitiven rezultat prebolelo okužbo. Nedavno ali akutno okužbo lahko s serološkimi metodami dokažemo na dva načina. Z odkrivanjem specifičnih protiteles IgM v akutnem serumu in z dokazom

najmanj štirikratnega povečanja količine protiteles IgG med akutnim in rekonvalescentnim serumom.

Aglutinacijski test

Z aglutinacijskim testom dokazujemo v preiskovanem serumu protitelesa, ki zlepljajo lateksne delce prevlečene z virusnim antigenom. Nastale komplekse med antigeni in protitelesi s prostim očesom opazimo le, ko je število molekul antigena in protiteles dovolj veliko. Zato je občutljivost testa manjša kot pri encimskoimunskem testu (27).

Encimskoimunska metoda

Encimskoimunske testi (ELISA) so eden od najbolj občutljivih in specifičnih imunskih preskusov za kvantitativno določanje protiteles (28). Princip testa je podrobno opisan v nadaljevanju diplomske naloge.

Dokaj hitro in zanesljivo lahko poleg protiteles IgG določamo tudi protitelesa IgM, ki so pomembni kazalci akutne okužbe (21). Serološke preiskave za ugotavljanje protiteles IgG in IgM v krvi novorojenčka niso povsem zanesljive zaradi morebitne nizke občutljivosti, a včasih z njimi dokazujejo znotrajmaternično okužbo pri sindromu kongenitalne varicelle (18).

1.7 ZDRAVLJENJE OKUŽB Z VZV

Cilji zdravljenja so zmanjševanje obolevnosti, preprečevanje simptomov in zapletov. Možnosti zdravljenja temeljijo na podlagi starosti bolnika, njegovega imunskega statusa in trajanja simptomov.

V skoraj vseh primerih so norice samo-omejujoča bolezen, kjer simptomatsko zdravljenje zadostuje (paracetamol za zniževanje telesne temperature, losjoni proti srbenju). Pri otrocih močno odsvetujejo aspirin, saj naj bi bil le-ta povezan z nastankom Reyevega sindroma, ki se kaže z motnjami zavesti, krči, vročino, glavobolom in bruhanjem (8). Nohti naj bodo porezani in očiščeni, da ne bi prišlo do sekundarne bakterijske okužbe. Iz istega razloga je priporočeno redno kopanje, po možnosti z antibakterijskim milom (7).

Aciklovir je uspešno zdravilo za zdravljenje herpetičnih sprememb na koži, sluznicah in očeh. Aciklovir oziroma aciklogvanozin spada v skupino nukleozidnih analogov. Zavira

virusni encim, polimerazo DNA, ki omogoča pomnoževanje virusne nukleinske kisline. Aciklovir se aktivira samo v prisotnosti polimeraze DNA v vseh celicah, ki so okužene s herpesvirusi. Aciklovir skrajša čas izločanja virusov, zmanjša bolečino in pospešuje celjenje. Na žalost nima večjega vpliva na virusno latenco in ponavljanje okužb. Ugodno deluje v akutnih primerih zostra, ne more pa bistveno zmanjšati poherpetičnih nevralgij. Običajno aciklovir uporabljamo kot mazilo, v težjih primerih ga dajemo peroralno ali intravensko. Zaradi majhne toksičnosti in selektivnega delovanja ga lahko uporabljamo pri bolnikih z zmanjšanim imunskim odzivom. Ne dajemo ga bolnikom z okvarami ledvic, ker je slabo topen in pri izločanju v ledvicah kristalizira (33).

Raziskave so pokazale, da zdravljenje z aciklovirjem peroralno v prvih 24 urah po nastopu bolezni zmanjša obolevnost in umrljivost. Ali naj se protivirusno zdravljenje uporablja pri sicer zdravih otrocih, še ostaja sporno (34). **Strokovnjaki** ne priporočajo rutinske peroralne uporabe aciklovirja v primerih nezapletenih noric pri zdravih otrocih zaradi stroškov zdravljenja in benigne narave noric (8).

Zdravljenje s protivirusnimi zdravili je obvezno za bolnike, ki lahko zbolijo za hudo obliko bolezni (imunokomprimirani in novorojenčki, katerih matere so se okužile v času poroda) in pri bolnikih z zapleti noric (pljučnica, encefalitis...) (8). Nekateri raziskovalci priporočajo aciklovir peroralno za nosečnice z noricami, predvsem v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti (7). Trenutno ni na voljo dovolj podatkov o varni in učinkoviti uporabi aciklovirja za preprečevanje noric po izpostavitvi v nosečnosti (18).

Aciklovir je najbolj učinkovit, če ga damo intravensko v času 72 ur po nastopu bolezni (8). Tako ga dajemo pri novorojenčkih s kongenitalnimi noricami, da preprečimo hujše posledice (18).

1.8 PREPREČEVANJE OKUŽB Z VZV

Metode preprečevanja oziroma zmanjševanja okužb z virusom varicella zoster se delijo na tiste pred izpostavljenostjo in tiste po izpostavljenosti. V skupino pred izpostavljenostjo spada cepivo proti noricam, medtem ko v skupino metod po izpostavitvi sodijo imunoglobulini varicella zoster, cepivo proti noricam in aciklovir.

1.8.1 CEPLJENJE

Proti virusnim okužbam izzovemo pridobljeno imunost tako, da vnesemo v telo oslABLJENE ali uničene viruse ali njihove sestavine, ki jih imenujemo cepiva oziroma vaccine. Cepiva delimo na živa in mrtva (inaktivirana). Večina živih cepiv je iz oslABLJENIH, nevirulentnih virusnih mutantov, ki se po vnosu v telo razmnožujejo in spodbujajo imunski odziv brez povzročanja bolezenskih znakov (29).

Cepivo proti noricam vsebuje živ oslABLJEN sev virusa varicella zoster Oka, vzgajan na kulturah humanih diploidnih celic. V sledovih vsebuje cepivo neomicin in želatino. Cepivo se shranjuje v liofilizirani obliki in se redči tik pred uporabo (30). Oka sev VZV je bil izoliran iz vezikularne tekočine zdravega otroka z noricami in oslABLJEN z večkratnim zaporednim presajevanjem v celičnih kulturah (8). Naključne mutacije (zamenjave enega ali več nukleotidov) med presajevanjem zmanjšajo možnost virusov za razmnoževanje in povzročijo izgubo virulence (29).

Leta 1974 so Takahashi in sodelavci na Japonskem razvili varno in učinkovito živo oslABLJENO cepivo proti noricam. Od leta 1995 pa je cepivo na voljo tudi v ZDA (31). Po vsem svetu je na voljo več cepiv različnih proizvajalcev: Varivax (proizvaja Merck), Varilrix (proizvaja GlaxoSmith Beecham) in Okavax (proizvaja Biken).

V Sloveniji uporabljamo cepivo Varilrix, proizvajalca SmithKline Beecham, vendar ni del rednega obveznega programa cepljenja. Obvezno cepljenje se ni izkazalo za stroškovno učinkovito zaradi visoke cene cepiva (32).

Cepivo je dobro imunogeno, varno in ga pacienti dobro prenašajo. Neželeni učinki pri otrocih so blagi (7). Daje se pod kožo, običajno v predel zgornjega dela nadlakti (30). Cepljenje v otroštvu je najprimernejše, ker se bolezen v tem času najbolj pojavlja in ker so otroci glavni izvor in prenašalci bolezni (8).

Med novejšimi priporočili je tudi cepljenje oseb po izpostavitvi, ki še niso prebolele noric. Cepljenje tri dni po izpostavljenosti lahko prepreči bolezen ali pa le spremeni inkubacijsko dobo in imunski odgovor na VZV (31).

1.8.2 PASIVNA ZAŠČITA Z IMUNOGLOBULINI

Hiperimuni gamaglobulini so posebni pripravki z visokimi odmerki imunoglobulinov (večinoma IgG) proti določenim antigenom. Pridobivajo jih z alkoholnim frakcioniranjem plazme prostovoljcev (35).

Imunoglobuline varicella zoster (VZIG) lahko dobi oseba, ki je bila izpostavljena noricam če, bolnik ni imun, če izpostavljenost lahko povzroči okužbo in kadar ima bolnik večje tveganje za zaplete kot v splošni populaciji (19). Z VZIG skušamo preprečiti ali vsaj omiliti pojav noric pri sprejemljivih nosečnicah, ki so bile izpostavljene noricam ali pasavcu. Kadar je mogoče, preverimo imunski status nosečnice, saj v večini primerov aplikacija VZIG ni potrebna zaradi že obstoječe imunosti (18). V primeru negativnega serološkega statusa, ko ne dokažemo specifičnih protiteles IgG, se priporoča uporaba VZIG v roku 72–96 ur po izpostavitvi. VZIG uporabljamo tudi pri novorojenčkih, katerih matere so zbolele za noricami 4-5 dni pred porodom ali 2 dni po porodu; bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom; novorojenčkih po 28. tednu nosečnosti, če mati noric ni prebolela; novorojenčkih pred 28. tednom nosečnosti ali tistih, ki ob rojstvu tehtajo manj od 1000 gramov ne glede na imunski status matere (19).

V Sloveniji je na voljo preparat Varitect za intravensko uporabo; 1ml na kilogram telesne teže (35). VZIG je drag in zagotavlja le začasno zaščito. Natančno trajanje zaščite ni znano, vendar bi morala trajati vsaj eno razpolovno dobo imunoglobulinov IgG, kar je približno tri tedne. Ponovna izpostavitvev nosečnice po tem obdobju zahteva še en odmerek VZIG (31).

2. NAMEN DELA

Čeprav večina okužb z virusom varicella zoster temelji na prepoznavnih kliničnih znakih, je v določenih primerih potrebna tudi laboratorijska diagnostika. Virus je posebej nevaren za nosečnice, saj lahko prva okužba med nosečnostjo povzroči razvojne nepravilnosti pri plodu ali pa ogrozi življenje nosečnice in ploda, če se okužba zgodi tik pred porodom ali takoj po njem. Ker je v času po izpostavitvi v kratkem časovnem oknu mogoče zaščititi nosečnico in plod s specifičnimi imunoglobulini, je določanje specifičnih protiteles proti virusu varicella zoster opredeljeno kot urgentna preiskava. Trenutno poteka določanje specifičnih protiteles IgG proti virusu varicelle zoster s klasično encimsko imunsko tehniko proizvajalca Siemens, ki je zamudna in tehnično zahtevna.

Iz praktičnih razlogov ter na podlagi študij, so se testi ELISA izkazali kot dovolj občutljivi in specifični za merjenje imunskega statusa pri okužbi z virusom varicella zoster. Zato smo uporabili test ELISA za referenčno metodo, s katero smo primerjali dva analizna postopka proizvajalcev Liaison in Vidas. Oba omenjena analizna postopka sta v primerjavi z referenčno metodo enostavnejša za uporabo in imata bistveno krajši čas analize.

Želeli smo pregledati serume pacientov, ki so bili poslani v laboratorij zaradi dokazovanja specifičnih protiteles proti virusu varicelle zoster in ugotoviti serološki status pacientov s tremi različnimi metodami.

Naš cilje je bil ugotoviti, ali bi specifična protitelesa IgG lahko ugotavljali tudi z analiznima postopkoma proizvajalcev Liaison in Vidas. Prav tako želimo določiti ujemanje, specifičnost in občutljivost teh dveh analiznih postopkov v primerjavi z referenčno metodo proizvajalca Siemens.

3. MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

V raziskavo je bilo vključenih 232 arhivskih vzorcev (serumov) pacientov, s sumom na izpostavljenost virusu varicella zoster. Serumi so pripadali nosečnicam, ki so bile stare med 16 in 42 let. Uporabili smo vzorce, ki so bili zbrani v obdobju dveh let, in sicer v letu 2009 in letu 2010.

Do našega testiranja so bili vsi vzorci shranjeni v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zaprtih plastičnih epruvetah in označeni z številko pacienta. Nedavno odvzeti vzorci so bili shranjeni v hladilniku pri temperaturi $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo vzorce odmrznili in jih ogreli na sobno temperaturo.

3.2 METODE

V diplomski nalogi smo dokazovali specifična protitelesa proti virusu varicella zoster s tremi različnimi metodami, in sicer s kemiluminiscenčno metodo (sistem Liaison, DiaSorin, Saluggia, Italija), encimsko imunsko metodo (sistem BEP[®] III Siemens, Marburg, Nemčija) in encimsko fluorescentno metodo (sistem Vidas, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Vsi serumu so bili predhodno že testirani s kemiluminiscenčno metodo, nekaj pa tudi z encimsko imunsko metodo. Popolnoma na novo smo vseh 232 vzorcev testirali z encimsko fluorescentno metodo. Vzorci, ki niso imeli rezultatov z vsemi tremi metodami, so bili testirani še z encimsko imunsko metodo.

Serološke preiskave smo izvajali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, in sicer v laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij.

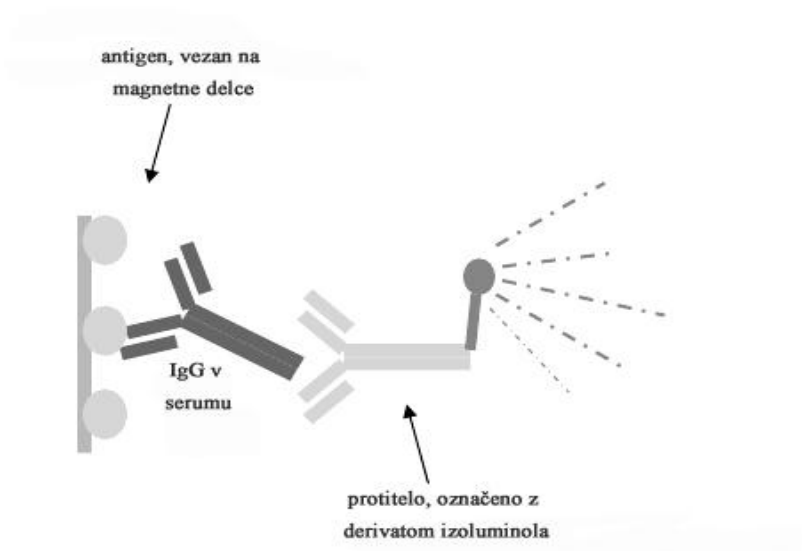
3.2.1 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA LIAISON

To metodo bom opisala manj podrobno, saj je nisem izvajala samostojno. Uporabila sem le rezultate, da smo jih lahko primerjali in ovrednotili glede na referenčno metodo proizvajalca Siemens.

Analizator LIAISON[®], omogoča izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na kemiluminiscenci. DiaSorin LIAISON[®] VZV IgG je diagnostični komplet za kvantitativno določanje specifičnih protiteles IgG proti virusu varicella zoster v človeškem serumu.

Princip testa

Kemiluminiscenčni test oziroma kemiluminiscenčni imunski test uporabljamo za posredno kvantitativno določanje specifičnih protiteles IgG proti virusu varicella zoster. V osnovi je test podoben encimsko imunskemu testu, le da tu uporabljamo magnetne delce (trdna faza), ki so prekriti z antigenom VZV in mišja monoklonska protitelesa proti človeškim IgG, ki so povezana z derivatom izoluminola. Med prvo inkubacijo se anti-VZV protitelesa IgG v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo konjugirana protitelesa reagirajo z anti-VZV protitelesi IgG, ki so vezana na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji se nevezan material s spiranjem odstrani. Nato se dodajo startni reagenti, ki vsebujejo vodikov peroksid in encim peroksidazo. Z dodajanjem peroksidaze spravimo derivat izoluminola v vzbujeno stanje. Peroksidaza pretvori H_2O_2 v vodo in povzroči oksidacijo izoluminola. Preko intermediatorjev prehaja derivat izoluminola v osnovno stanje, pri čemer oddajo svetlobo v obliki kemiluminiscence. Fotopomnoževalka zazna svetlobo v relativnih svetlobnih enotah (RLU; ang.: relative light units) in je sorazmerna koncentraciji protiteles proti VZV v vzorcih, kalibratorjih ali kontrolah (36).



Slika 3: Princip kemiluminiscenčnega testa

Vrednotenje rezultatov

Analizator avtomatično izračuna koncentracijo protiteles VZV IgG, ki je izražena v mili internacionalnih enotah/mililiter (mIU/mL) in razvrsti rezultat kot pozitiven ali negativen. Merilno območje sega od 10 do 4000 mIU/mL VZV IgG. Če je količina protiteles nad merilnim območjem, lahko vzorec predhodno razredčimo. Rezultate vzorcev si razlagamo na naslednji način (36):

- koncentracija manjša od 50 mIU/mL pomeni negativen rezultat
- koncentracija med 50 in 100 mIU/mL pomeni mejni rezultat, vendar rezultate obravnavamo kot negativne
- koncentracija nad 100 mIU/mL pomeni pozitiven rezultat

3.2.2 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA SIEMENS

V rutinski diagnostiki je za odkrivanje protiteles IgG, specifičnih za virus VZV, najprimernejša metoda ELISA. Reagenčni komplet Enzygnost[®] Anti-VZV/IgG se uporablja za kvalitativno zaznavanje in kvantitativno določanje protiteles IgG v serumu in plazmi na instrumentih Siemens.

Princip testa

Protitelesa IgG iz vzorca, ki so specifična za VZV, se vežejo na antigen, ki je vezan v vdolbinicah mikrotiterske ploščice. Nato se sekundarna proti človeškim IgG usmerjena protitelesa, ki so označena s peroksidazo, vežejo na specifična protitelesa IgG. Encim peroksidaza katalizira delovno raztopino s substratom in ta postane modre barve. Reakcijo se prekine z dodatkom stop raztopine, ki ustavi delovanje peroksidaze in tako se barva raztopine spremeni do rumene. Absorbanco merimo s fotometrom pri valovni dolžini 450 nm. Intenzivnost rumene barve je sorazmerna količini specifičnih anti-VZV protiteles IgG v vzorcu. Aktivnost protiteles količinsko opredelimo v mednarodnih enotah (mIU/mL) (37).



Slika 4: Princip encimsko imunskega testa

Komplet reagentov in laboratorijska oprema

Za izvedbo encimsko imunskega testa smo potrebovali analizator BEP[®] III SIEMENS in naslednje sestavine reagenčnih kompletov Enzygnost[®] Anti-VZV/IgG in Enzygnost[®] TMB (37):

- mikrotiterska ploščica: 48 vdolbinic, prekritih z inaktiviranim VZV antigenom. Vdolbinice v levi vrsti vsakega stripa so prekrte z antigenom, ki izvira iz okuženih celic z VZV, vdolbinice v desni vrsti pa so prekrte z neinficiranimi celicami (kontrolni antigen)
- konjugat IgG: 1 mL, mišja protitelesa proti človeškim IgG, konjugirana s peroksidazo. Konjugat je zelene barve.
- konjugatni pufer: 12,5 mL, EDTA in fosfatni pufer
- kontrola: 0,4 mL, človeški serum s protitelesi IgG proti antigenom VZV v puferni raztopini Tris
- pufer za redčenje vzorcev: 50 mL, puferna raztopina Tris/HCl
- substrat: tetrametilbenzidin – TMB
- stop raztopina za ustavitev reakcije

Postopek

Pred začetkom izvajanja smo reagente in serume ogreli na sobno temperaturo 18-25 °C. Prve štiri korake smo izvedli ročno, naslednje korake pa je analizator izvajal avtomatično, ker uporablja sistem BEP[®] III (37).

1. Priprava reagentov:

- ✓ konjugat IgG (250 µL konjugata smo dali v stekleničko z 12,5 mL konjugatnega pufera)

- ✓ obarvan pufer za redčenje (uporabljamo za redčenje vzorcev in ne za direktno pipetiranje na mikrotitrno ploščico. 2,5 mL obarvane raztopine smo dali k 50 mL pufru za redčenje vzorcev)
2. Redčenje vzorcev: epruvete ustrezno označimo in v vsako odpipetiramo 400 μL obarvanega pufru za redčenje in 20 μL vzorca. Redčine serumov smo narahlo premešali s pipetiranjem.
 3. Vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice napolnimo z 200 μL brezbarvnega pufru za redčenje vzorcev.
 4. V vdolbinice nanese po 20 μL razredčenih serumov. Na začetku in na koncu serije oziroma mikrotitrne ploščice moramo vedno napipetirati 20 μL kontrole.

Za izvedbo postopka smo potrebovali še zaščitne rokavice, epruvete, stojalo za epruvete, pipete in nastavke za pipete.

Vrednotenje rezultatov

Vsem vzorcem ter kontroli smo izmerili absorbance. Ker analizator uporablja BEP[®] III sistem, poteka vrednotenje samodejno. Računalnik je absorbance izračunal tako, da je odštel optično gostoto kontrolnega antigena od ustrezne vdolbinice z antigenom. Pri negativnih rezultatih zapišemo samo vrednost izmerjene absorbance. Vzorce, ki imajo protitelesno aktivnost večjo od 50 mIU/mL, vrednotimo kvantitativno po naslednji formuli: $\log_{10} \text{ mIU/mL} = \alpha \times \Delta A^\beta$, kjer sta α in β konstanti, specifični za serijo reagentov (37). Spodnja preglednica prikazuje referenčne vrednosti.

Preglednica I: Kriteriji za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje

Absorbanca	Razlaga	Aktivnost [mIU/mL]
$\Delta A < 0,100$	Negativen rezultat	< 50
$0,100 \leq \Delta A \leq 0,200$	Mejni rezultat	50 - 100
$\Delta A > 0,200$	Pozitiven rezultat	> 100

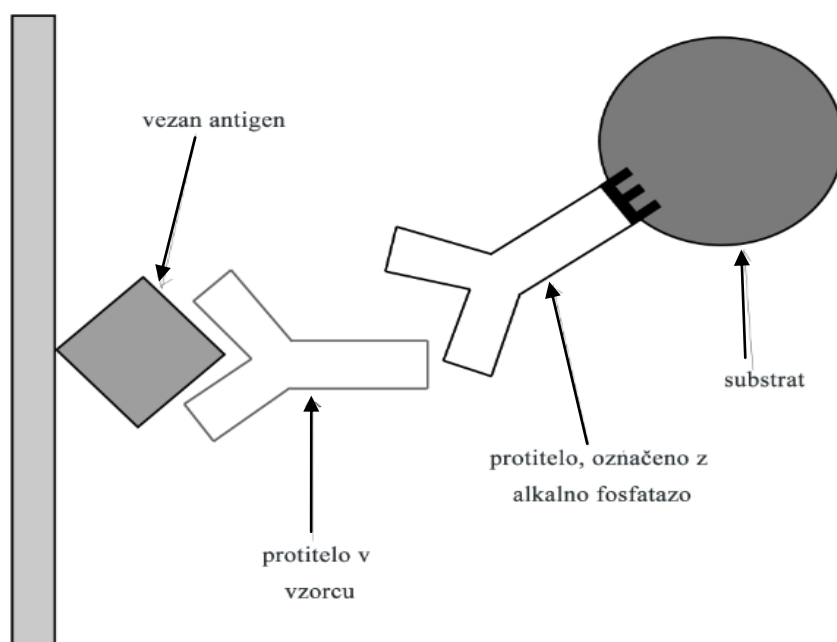
Navodila za Enzygnost[®] Anti-VZV/IgG test navajajo, da je potrebno mejne rezultate še enkrat testirati.

3.2.3 ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA VIDAS

VIDAS[®] Varicella-Zoster IgG (VZG) je kvalitativen test, ki se uporablja na instrumentih Vidas za določanje protiteles IgG proti virusu varicelle zoster v serumu z encimsko fluorescentno tehniko. Test služi kot pomoč pri ugotavljanju imunskega statusa na okužbo z virusom varicella zoster.

Princip testa

Določanje protiteles IgG temelji na dvostopenjski encimsko imunski sendvič tehniki s končno fluorescentno detekcijo. Inaktiviran varicella zoster virusni antigen je vezan v notranjosti nastavka. Nastavek služi hkrati kot trdna faza in pripomoček za pipetiranje. Po predhodnem koraku izpiranja in redčenja vzorca, se anti-VZV protitelesa IgG iz vzorca vežejo na antigen, s katerim je prevlečena notranjost nastavka. Nevezane komponente vzorca odstranimo s spiranjem. V naslednjem koraku se vezanim protitelesom IgG doda sekundarna protitelesa proti človeškim protitelesom IgG, ki so označena z alkalno fosfatazo. S spiranjem odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. Nato dodamo ustrezní substrat (4-metilumbeliferil fosfat), ki ga encim hidrolizira do fluorescenčnega produkta (4-metilumbeliferon), katerega fluorescenco merimo pri valovni dolžini 450 nm. Intenziteta fluorescence je sorazmerna koncentraciji anti-VZV protiteles IgG v vzorcu (38).



Slika 5: Princip encimsko fluorescenčnega testa

Komplet reagentov in laboratorijska oprema

Za dokaz specifičnih protiteles IgG smo potrebovali analizator miniVIDAS™ in naslednje sestavine reagenčnega kompleta VIDAS® Varicella-Zoster IgG (38):

- 60 kartuš s pripravljenimi reagenti za uporabo
- 2 x 30 nastavkov, katerih notranjost je prevlečena z inaktiviranim varicella zoster antigenom (sev Sissy)
- S1 standard 2 ml (človeška plazma brez fibrina, ki vsebuje protitelesa proti virusu varicella zoster + 1g/l natrijevega azida)
- C1 pozitivna kontrola 2 ml (človeška plazma brez fibrina, ki vsebuje protitelesa proti virusu varicella zoster + 1g/l natrijevega azida)
- C2 negativna kontrola 2 ml (človeška plazma brez fibrina, ki ne vsebuje protiteles proti virusu varicelle zoster + 1g/l natrijevega azida)
- MLE kartico, ki vsebuje tovarniško nastavljene črtne kode za izvedbo kalibracije testa



Slika 6: Kartuša z reagenti in nastavek

Kot vidimo na sliki 1, je kartuša sestavljena iz desetih vdolbinic, ki so prekrivane s folijo. Folija je označena z bar kodo, serijsko številko kompleta in datumom veljavnosti. Na prvi vdolbinici je folija že preluknjana zaradi lažjega nanosa vzorca. Zadnja vdolbinica vsake kartuše je pravzaprav kiveta s substratom, kjer pride do fluorescence. Ostale vdolbinice v srednjem delu vsebujejo različne reagentne, ki so potrebni za izvedbo testa.

Ostali potrebni material: pipete, nastavki za pipete, staničevina, mešalo vorteks in zaščitne rokavice.

Postopek

Preden začnemo z uporabo nove serije reagentov, je potrebno izvesti kalibracijo s standardi. Še pred tem moramo v analizator vstaviti MLE kartico, ki je prav tako kot standard priložena vsakemu kompletu reagentov. Kalibracija se izvaja vsakih 14 dni, standard S1 pa se mora testirati v dveh izvodih. Pri novi seriji reagentov ali vsaki kalibraciji, moramo preveriti tudi pozitivno in negativno kontrolo.

Test smo izvedli po navodilih proizvajalca, in sicer (38):

1. Serume smo odmrznili. Kartuše smo pustili, da se ogrejejo na sobno temperaturo.
2. Vsako kartušo smo označili z zadnjima dvema številka, ki pripadata vzorcu.
3. Serume, kontrole in standard smo dobro premešali na vorteksu.
4. Odpipetirali smo 100 μ l vzorca, kontrole ali standarda v vdolbinico kartuše.
5. V analizator smo vstavili nastavke in kartuše. Odčitali smo bar kode vzorcev, kontrol ali standarda v enakem vrstnem redu, kakor smo jih vstavili v analizator.
6. Analizator je avtomatično izvedel vse stopnje testa. Test je končan v približno 35–40 minutah, kolikor je potrebno za analizo šestih vzorcev.

Vrednotenje rezultatov

Ko je test končan, računalnik avtomatsko analizira rezultate. Za vsak vzorec se fluorescenca izmeri dvakrat. Najprej se izmeri samo ozadje kivete, druga meritev pa se izvede po inkubaciji substrata z encimom. Relativna vrednost fluorescence (RFV) se izračuna tako, da se končnemu rezultatu odšteje ozadje. Analizator interpretira rezultate na osnovi relativne vrednosti fluorescence, tako dobimo vrednost testa iz kvocienta med RFV vzorca in RFV standarda (38). Referenčne vrednosti prikazuje spodnja preglednica.

Preglednica II: Mejne vrednosti in interpretacija rezultatov analiznega postopka proizvajalca Vidas

Vrednost testa	Razlaga
< 0,60	Negativen rezultat
0,60 – 0,90	Mejni rezultat
≥ 0,9	Pozitiven rezultat

V navodilih proizvajalca Vidas je navedeno, da je treba mejne rezultate ponoviti z novo odvzetim svežim vzorcem. Če novega vzorca ne moremo pridobiti, ponovimo test z originalnim vzorcem, če le-ta ni okužen z mikrobi ali lipemičen. Če ponovno dobimo mejni rezultat, uporabimo drugo metodo.

4. REZULTATI

4.1 REZULTATI PREISKAV

V diplomski nalogi smo dokazovali prisotnost specifičnih protiteles v serumu proti virusu varicelle zoster. Specifična protitelesa razreda IgG smo dokazovali s tremi različnimi analiznimi postopki proizvajalcev Liaison, Siemens, in Vidas.

Preglednica III: Struktura vzorca glede uporabljenega analiznega postopka

Rezultati testiranja	Analizni postopek					
	Analizni postopek proizvajalca Liaison		Analizni postopek proizvajalca Siemens		Analizni postopek proizvajalca Vidas	
	f	%	f	%	f	%
Pozitivni	214	92,2	217	93,5	193	83,2
Negativni	18	7,8	14	6,1	19	8,2
Mejni	0	0	1	0,4	20	8,6
Skupaj	232	100	232	100	232	100

Iz preglednice IV je razvidno, da smo rezultate vsakega analiznega postopka posebej razvrstili v tri skupine: pozitivni, mejni in negativni rezultati. Če primerjamo rezultate vseh

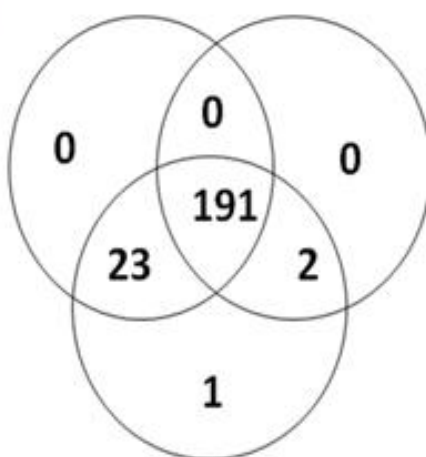
treh analiznih postopkov, ugotovimo, da smo dobili največji delež pozitivnih rezultatov z analiznim postopkom proizvajalca Siemens, ki znaša 93,1 %, sledi mu analizni postopek proizvajalca Liaison z 92,2 % in nazadnje analizni postopek proizvajalca Vidas 83,2 %. Deleži z negativnimi rezultati so si precej podobni, 8,2 % je negativnih z analiznim postopkom proizvajalca Vidas, sledita mu analizni postopek proizvajalca Liaison z 7,8 % in nato analizni postopek proizvajalca Siemens z 6,1 %. Pri mejnih rezultatih prevladuje analizni postopek proizvajalca Vidas z 8,6 %, analizni postopek proizvajalca Siemens ima 0,4 % in analizni postopek proizvajalca Liaison brez mejnih rezultatov.

Iz podatkov, ki smo jih navedli v zgornji preglednici lahko za vsak analizni postopek posebej izračunamo, kakšna je prekuženost v populaciji nosečnic. Tako pri analiznem postopku proizvajalca Liaison znaša prekuženost 92,2 % (214/232), pri analiznem postopku proizvajalca Siemens dobimo 93,5 % (217/232) in najmanjša prekuženost 83,2 % (193/232) pri analiznem postopku proizvajalca Vidas.

4.2 UJEMANJE REZULTATOV

Analizni postopek
proizvajalca Liaison

Analizni postopek
proizvajalca Vidas



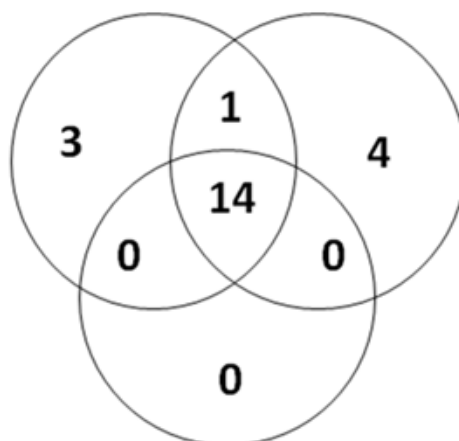
Analizni postopek
proizvajalca Siemens

Slika 7: Ujemanje pozitivnih rezultatov testiranja s tremi različnimi analiznimi postopki

Kot vidimo na zgornji sliki, se je z vsemi tremi metodami ujemalo 191 pozitivnih vzorcev, kar predstavlja 82,3 % celotnega števila vzorcev. Številke v srednjem obroču predstavljajo vzorce, ki so bili pozitivni z dvema metodama. Tako je bilo 23 vzorcev pozitivnih hkrati z analiznim postopkom proizvajalca Liaison in analiznim postopkom proizvajalca Siemens, dva vzorca pa z analiznim postopkom proizvajalca Vidas in analiznim postopkom proizvajalca Siemens. V zunanjem obroču vidimo, da smo dobili en vzorec, ki je bil pozitiven le z analiznim postopkom proizvajalca Siemens. Pri analiznem postopku proizvajalca Liaison in analiznim postopkom proizvajalca Vidas ni bilo vzorcev, ki bi bili pozitivni samo z enim analiznim postopkom.

Analizni postopek
proizvajalca Liaison

Analizni postopek
proizvajalca Vidas



Analizni postopek
proizvajalca Siemens

Slika 8: Ujemanje negativnih rezultatov testiranja s tremi različnimi analiznimi postopki

Štirinajst (6,03 %) negativnih vzorcev se je ujemalo z vsemi tremi analiznimi postopki, kar je prikazano tudi na sliki 3. V srednjem obroču smo dobili en vzorec, ki je bil negativen z dvema analiznima postopkoma proizvajalcev Liaison in Vidas. V zunanjem obroču smo dobili 3 vzorce, ki so bili negativni samo z analiznim postopkom proizvajalca Liaison in 4 vzorce, ki so bili negativni le z analiznim postopkom proizvajalca Vidas. Vzorcev, ki bi bili negativni le z analiznim postopkom proizvajalca Siemens, nismo dobili.

4.3 OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Občutljivost je sposobnost testa, da za pozitivni vzorec poda pozitivni rezultat. Negativen rezultat pri okuženih osebah pomeni lažno negativen rezultat (25). Občutljivost praktično pomeni sposobnost analiznega postopka, da se že na majhno spremembo v koncentraciji odzove z velikim signalom (39).

Specifičnost testa pa je odstotek zdravih, neokuženih oseb, kjer je rezultat testa negativen. Pozitiven rezultat pri osebah, ki nimajo bolezni, se vrednoti kot lažno pozitiven (25). Analitična specifičnost torej pomeni sposobnost metode, da v zmesi podobnih snovi izmeri koncentracijo našega analita IgG (39).

Občutljivost in specifičnost prikazujeta spodnji enačbi:

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

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

Preglednica V: Termini za izračun občutljivosti in specifičnosti testov

Rezultati testiranja	Pravilni rezultati - zlati standard	
	Pozitivni	Negativni
Pozitivni	Pravilno pozitivni	Lažno pozitivni
Negativni	Lažno negativni	Pravilno negativni

Preglednica VI prikazuje razmerja med posameznimi termini za izračun občutljivosti in specifičnosti analiznih postopkov. V našem primeru smo za referenčno metodo vzeli analizni postopek proizvajalca Siemens, s katerim smo primerjali ostali dve metodi. Kot resnično oziroma pravilno pozitivne ali resnično negativne smo ovrednotili tiste rezultate, ki so bili skladni s primerjajočima se analiznima postopkoma. Lažno pozitivni ali negativni rezultati pa so bili neskladni v primerjavi z analiznim postopkom proizvajalca Siemens.

4.3.1 PRIMERJAVA REZULTATOV MED ANALIZNIMA POSTOPKOMA PROIZVAJALCEV SIEMENS IN LIAISON

Vzorci smo testirali za prisotnost specifičnih protiteles VZV IgG. Nato smo rezultate referenčnega analiznega postopka proizvajalca Siemens primerjali z analiznim postopkom proizvajalca Liaison, kar prikazuje spodnja preglednica.

Preglednica VII: Primerjava rezultatov dveh analiznih postopkov proizvajalcev Siemens in Liaison

ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA LIAISON	ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA SIEMENS			
	Pozitivni	Negativni	Mejni	Skupaj
Pozitivni	214	0	0	214
Negativni	3	14	1	18
Mejni	0	0	0	0
Skupaj	217	14	1	232

Rezultati so bili skladni pri 228 (98,3 %) preiskovanih vzorcih, neskladni pa pri štirih vzorcih (1,7 %). Z obema analiznima postopkoma smo dobili skladne rezultate pri 214 (92,2 %) pozitivnih vzorcih in 14 (6,0 %) negativnih vzorcih. Pri treh vzorcih smo dobili z analiznim postopkom proizvajalca Siemens pozitiven rezultat, z analiznim postopkom proizvajalca Liaison pa negativnega. En vzorec je analizni postopek proizvajalca Liaison ovrednotil kot negativnega, analizni postopek proizvajalca Siemens pa kot mejnega.

Podatki o občutljivosti in specifičnosti za analizni postopek proizvajalca Liaison glede na referenčno metodo proizvajalca Siemens:

$$\text{občutljivost} = \frac{214}{214 + 3} \times 100 = 98,6 \%$$

$$\text{specifičnost} = \frac{14}{14 + 0} \times 100 = 100 \%$$

Zgornji izračun je pokazal, da znaša občutljivost analiznega postopka proizvajalca Liaison 98,6 %, specifičnost pa 100 % pri 14 pravilno negativnih in brez lažno pozitivnih vzorcev.

4.3.2 PRIMERJAVA REZULTATOV MED ANALIZNIMA POSTOPKOMA PROIZVAJALCEV SIEMENS IN VIDAS

V spodnji preglednici smo rezultate encimsko imunske metode sistema Siemens primerjali glede skladnosti in neujemanja z analiznim postopkom proizvajalca Vidas.

Preglednica VIII: Primerjava rezultatov dveh analiznih postopkov proizvajalcev Siemens in Vidas

ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA VIDAS	ANALIZNI POSTOPEK PROIZVAJALCA SIEMENS			
	Pozitivni	Negativni	Mejni	Skupaj
Pozitivni	193	0	0	193
Negativni	4	14	1	19
Mejni	20	0	0	20
Skupaj	217	14	1	232

Pri določanju protiteles IgG proti virusu varicella zoster smo dokazali skladne rezultate na obeh sistemih pri 193 (83,2 %) pozitivnih in 14 (6,0 %) negativnih vzorcih. Skupno število skladnih rezultatov je bilo 207 (89,2 %), neskladnih pa 25 (10,8 %) preiskovanih vzorcev. Pri štirih vzorcih smo z analiznim postopkom proizvajalca Siemens ugotovili pozitiven rezultat, medtem ko je analizni postopek proizvajalca Vidas pokazal negativnega. Dvajset pozitivnih rezultatov z analiznim postopkom proizvajalca Siemens je analizni postopek proizvajalca Vidas ovrednotil kot mejnih. Mejni rezultat z analiznim postopkom proizvajalca Siemens je pripadal negativni vrednosti z analiznim postopkom proizvajalca Vidas.

Spodaj so prikazani podatki o občutljivosti in specifičnosti za analizni postopek proizvajalca Vidas glede na referenčno metodo proizvajalca Siemens:

$$\text{občutljivost} = \frac{193}{193 + 24} \times 100 = 88,9 \%$$

$$\text{specifičnost} = \frac{14}{14 + 0} \times 100 = 100 \%$$

Občutljivost analiznega postopka proizvajalca Vidas je pri 193 resnično pozitivnih in 24 lažno negativnih vzorcih znašala 88,9 %. Ker lažno pozitivnih rezultatov ni bilo, je bila specifičnost analiznega postopka 100 %.

4.4 MEJNI REZULTATI

S testiranjem specifičnih protiteles proti virusu varicella zoster smo ugotovili, da smo z dvema analiznima postopkoma dobili mejne rezultate, in sicer enega z analiznim postopkom proizvajalca Simens in 20 (8,6 %) vzorcev z analiznim postopkom proizvajalca Vidas. Analizni postopek proizvajalca Liaison ni ovrednotil nobenega mejnega rezultata.

Minimalni mejni rezultat z analiznim postopkom proizvajalca Vidas znaša 0,64, maksimalni pa 0,87. Izračunana povprečna vrednost vseh dvajsetih mejnih rezultatov z encimsko fluorescenčno metodo znaša 0,77. Edini mejni vzorec, ki smo ga dobili z analiznim postopkom proizvajalca Simens znaša 73 mIU/mL.

5. RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo testirali 232 serumov nosečnic s sumom na izpostavljenost z VZV. Ugotoviti smo želeli primernost uporabe hitrih testov za določanje specifičnih protiteles IgG v primerjavi z referenčno encimsko imunsko metodo, ki jo v laboratoriju uporabljajo rutinsko. Avtomatizirani testi, ki temeljijo na osnovi kemiluminiscence, so enostavni za uporabo in imajo bistveno krajši čas analize kot ELISA (30-45 minut v primerjavi s 3-4 ure).

"Zlati standard" za dokazovanje okužbe z VZV IgG je test FAMA – fluorescentna protitelesa proti membranam (40). Test je najbolj zanesljiv serološki pokazatelj zaščitenosti neimuniziranih posameznikov s specifičnimi protitelesi IgG. Ker je metoda zahtevna in zamudna, v večini laboratorijev ni na voljo. Iz praktičnih razlogov ter na podlagi študij, so se testi ELISA izkazali v dobri korelaciji s testom FAMA ter dovolj občutljivi in specifični za merjenje imunskega statusa pri okužbi z virusom varicella zoster (8).

Pri določanju VZV IgG smo ugotovili, da je dal analizni postopek proizvajalca Liaison 214 (92,2 %) VZV IgG pozitivnih rezultatov in 18 negativnih (7,8 %). Pri analiznem postopku proizvajalca Siemens je bilo nekaj več pozitivnih 217 (93,5 %), 14 (6,0 %) negativnih in en mejni (0,4 %). Analizni postopek proizvajalca Vidas je zaznal najmanj pozitivnih rezultatov VZV IgG 193 (83,2 %), 19 (8,2 %) negativnih ter največ mejnih rezultatov 20 (8,6 %).

Naše rezultate smo primerjali z raziskavo, ki je bila narejena leta 2008 v Veliki Britaniji. V raziskavi so primerjali izvedbo DiaSorin Liaison testa in Biomerieux Vidas VZV IgG testa z referenčnim VZV IgG časovno rešenim imunsko fluorescenčnim testom. Z vsemi tremi metodami, VZV-TRFIA, Vidas in Liaison so testirali 63 serumov nosečnic, ki so bile dovzetne za okužbo VZV. Poleg nosečnic pa so testirali tudi 62 serumov različnih posameznikov. Za 37 od 63 serumov nosečnic (58,7 %) se je izkazalo, da so VZV IgG negativni z metodo TRFIA in 26 (41,2 %) pozitivnih. Od drugih 62 serumov pa jih je bilo 11 (17,7 %) VZV IgG negativnih in 51 (82,2 %) pozitivnih z metodo TRFIA (40).

Glede občutljivosti in specifičnosti v primerjavi z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens so naši rezultati pokazali, da za analizni postopek proizvajalca Liaison znaša občutljivost 98,6 % in specifičnost 100 %, za analizni postopek proizvajalca Vidas pa 88,9 % in 100 %. Ob primerjavi obeh testov z referenčno metodo, sta testa dosegla visoko občutljivost, ki je bila > 88 % in 100 % specifičnost. Dokazali smo, da je analizni postopek proizvajalca Liaison nekoliko bolj občutljiv kot analizni postopek proizvajalca Vidas.

Rezultati raziskave iz leta 2008 v Veliki Britaniji so bili v primerjavi z našimi rezultati precej drugačni, vsaj kar se tiče izračunane občutljivosti. Občutljivost in specifičnost testa Vidas v primerjavi z TRFIA sta bili 54,5 % in 97,9 %, in za test Liaison 67 % in 100 % v primerjavi z TRFIA. Oba avtomatizirana testa, tako LIAISON kot Vidas, sta dosegla zelo visoko specifičnost (> 95 %) v primerjavi z referenčno metodo VZV-TRFIA. Obema testoma primanjkuje občutljivost, pa vendar je test Liaison bolj občutljiv (67 %) kot test Vidas (54,5 %) (40).

BioMerieux, proizvajalec analiznega postopka Vidas navaja, da je pri preskušanju 364 vzorcev, z uporabo komercialno dostopnega posrednega fluorescenčnega testa in komercialno dostopnega testa z lateks aglutinacijo, občutljivost in specifičnost njihovega

analiznega postopka večja od 98 % in večja od 90 %. V objavljeni študiji za analizni postopek proizvajalca Vidas, je metoda pokazala dobro ujemanje s komercialno dostopno VZV lateksno aglutinacijo (38).

DiaSorin, proizvajalec testa LIAISON pa je testiral 393 vzorcev za prisotnost protiteles VZV IgG v primerjavi s tremi referenčnimi metodami in dobil diagnostično občutljivost 100 % (319/319), specifičnost pa 97,1 % (67/70) (36).

Pri preučevanju skladnosti rezultatov smo ugotovili, da znaša ujemanje med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison 98,3 % (228/232) in 89,2 % (207/232) med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Vidas. Analizni postopek Liaison se je izkazal kot boljši, saj se veliko bolje ujema z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens kot analizni postopek proizvajalca Vidas.

Še ena raziskava je bila izvedena leta 2007, ki se je ukvarjala s primerjavo med testoma Liaison in referenčno metodo ELISA. Analizirali so 165 vzorcev (serumov) različnih pacientov: nosečnice, najstniki, hospitalizirani pacienti, bolniki s hematološkimi boleznimi in neopredeljeni posamezniki. Ujemanje med testom Liaison in ELISA IgG VZV je znašalo 95,8% (158/165) (41), kar potrjuje naše rezultate ujemanja.

Izračun prekuženosti nosečnic v Sloveniji je pokazal, da je le-ta več kot 90 % z analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison, medtem ko znaša 83,2 % z analiznim postopkom proizvajalca Vidas. V razvitih državah je prekuženost v populaciji nosečnic med 80 in 90 %. V laboratoriju na Inštitutu za mikrobiologijo so testirali 457 žensk v rodni dobi in odkrili samo 42 žensk brez protiteles proti VZV. Torej je prekuženost v odrasli dobi več kot 90 % (18).

Z analiznim postopkom proizvajalca Vidas smo določili 20 (8,6 %) vzorcev z mejno vrednostjo. Mejnih rezultatov nismo ponovili s svežim vzorcem. Povprečna vrednost je bila 0,77. Vrednost testa med 0,60 in 0,90 pomeni, da si rezultat razlagamo kot neopredeljen. S primerjavo rezultatov 20 vzorcev še z analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison, ugotovimo, da je analizni postopek proizvajalca Siemens vse rezultate z mejno vrednostjo ovrednotil kot pozitivne. Z analiznim postopkom proizvajalca Liaison pa smo med temi vzorci opredelili 19 pozitivnih in enega negativnega. Ugotovili smo, da serumi z mejno vrednostjo opredeljeni z analiznim postopkom proizvajalca Vidas, z analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison zelo

pogosto vsebujejo zadostno količino protiteles, ki so prisotna v taki količini, da jih opredelimo kot zaščitna. Maple s sodelavci je v raziskavi ugotovil nekaj podobnega, in sicer, da je 56% serumov z mejno vrednostjo z analiznim postopkom proizvajalca Vidas imelo zaščitno raven VZV-IgG protiteles z metodo VZV-TRFIA (40).

Vrednost za edini vzorec z mejno vrednostjo, ki ga je kot takega opredelil analizni postopek proizvajalca Siemens znaša 73 mIU/mL. Mejnega rezultata nismo testirali še enkrat. Ostala dva analizna postopka proizvajalcev Liaison in Vidas pa sta vzorec označila kot negativnega. Dve nedavni študiji sta pokazali, da je 58 % do 88 % vzorcev, ki imajo mejne rezultate s komercialnim testom ELISA, pozitivnih s testom FAMA ob 1:2 redčenju (42).

Zaključek vseh rezultatov nam pove, da lahko uporabimo analizni postopek proizvajalca Liaison v diagnostične namene, saj smo z aparaturo LIAISON dobili podobne rezultate kot z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens. Tega pa ne moremo trditi za analizni postopek proizvajalca Vidas, ki se je izkazal kot manj občutljiv kot analizni postopek proizvajalca Liaison. Analizni postopek proizvajalca Vidas je manj uporaben za dokazovanje tako majhnih količin specifičnih protiteles VZV IgG. Poleg tega je analizni postopek proizvajalca Vidas več rezultatov ovrednotil kot mejnih, ki so se ob uporabi ostalih dveh analiznih postopkov večinoma izkazali kot pozitivni. To pomeni, da so mejne vrednosti morda napačno postavljene za populacijo, ki smo jo vključili v okviru diplomskega dela.

Odstopanja so lahko nastala tudi zaradi tega, ker so bili vzorci predhodno že testirani in zamrznjeni. Morda je na naše rezultate vplival izbor vzorcev, saj smo se usmerili le na nosečnice. Morda bi dobili drugačne rezultate, če bi izbrali za testiranje drugačno populacijo pacientov, ki bi vključevala tako ljudi z znano anamnezo prebolelih noric in take, ki noric še niso preboleli.

Pomembno je, da laboratorij sprejme v uporabo zelo občutljive in specifične teste za odkrivanje specifičnih protiteles VZV IgG, saj to lahko vodi do znatno zmanjšane uporabe specifičnih imunoglobulinov pri sprejemljivih nosečnicah, ki so bile izpostavljene bolniku z noricami ali pasavcu, kar je precejšnja prednost zaradi nižjih stroškov in varnosti pacientov (40).

6. SKLEP

- Pri sumu na okužbo z VZV pri nosečnicah urgentno določamo specifična protitelesa IgG proti VZV.
- Med 232 testiranimi serumskimi vzorci nosečnic smo z referenčnim analiznim postopkom proizvajalca Siemens dokazali, da je 217 pacientov oziroma 93,5 % vseh preiskovancev že prebolelo okužbo z VZV.
- Ujemanje rezultatov testiranja za VZV IgG smo ugotovili pri 228 (98,3 %) vzorcih med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Liaison ter pri 207 (89,2 %) vzorcih med analiznima postopkoma proizvajalcev Siemens in Vidas.
- Analizni postopek proizvajalca Liaison se je izkazal kot bolj občutljiv (98,6 %) v primerjavi z analiznim postopkom proizvajalca Vidas (88,9 %), glede specifičnosti pa razlik ni bilo zaznati (100 % za analizni postopek proizvajalca Liaison in 100 % za analizni postopek proizvajalca Vidas).
- Analizni postopek proizvajalca Vidas se je tako v naši diplomski nalogi kot tudi v drugih raziskavah izkazal kot manj primeren za uporabo v laboratoriju, zaradi prenizke občutljivosti.
- Rezultati so pokazali, da analizni postopek proizvajalca Liaison lahko uporabimo za določevanje specifičnih protiteles VZV IgG, saj daje primerljive rezultate kot referenčni analizni postopek proizvajalca Siemens, je manj zahteven in hitrejši.

7. LITERATURA

1. Carter JB, Saunders VA. *Virology: principles and applications*. England: John Wiley & Sons, 2007: 121-128.
2. Drinovec B. Poimenovanje in razvrstitev virusov. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al. *Splošna medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2007: 13–21.
3. Rahaus M, Desloges N, Wolff HF. *Molecular Biology of Varicella–Zoster Virus*. *Monogr Virol* 2006; 26: 1–8.
4. McGeoch DJ. Lineages of varicella-zoster virus. *J General Virology* 2009; 90: 963–969.
5. Kraigher A, Hočevár GA, Marinič FN. Epidemiologija bakterijskih okužb. In: Bregant L. *Nebakterijske okužbe v perinatologiji*. Ljubljana: Društvo za pomoč prezgodaj rojenim otrokom, 1998: 5–15.
6. Rakar R. Okužba z varicella – zoster virusom v nosečnosti: nevarnost in ukrepanje. In: Bregant L. *Nebakterijske okužbe v perinatologiji*. Ljubljana: Društvo za pomoč prezgodaj rojenim otrokom, 1998: 33–37.
7. Leung AK, Kellner JD, Davies HD. Chickenpox: An update. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* 2009; 4: 343–350.
8. Heininger U, Seward JF. Varicella. *Lancet* 2006; 368: 1365–1376.
9. Arvin AM. Chickenpox (Varicella). In: Wolff MH, Schunemann S, Schmidt A. *Varicella– zoster virus: Molecular biology, pathogenesis, and clinical aspects*. Basel: Karger, 1999: 96–111.
10. Sočan M, Novak-Mlakar D, Ogrin-Rehberger P. Pasavec – dostopni epidemiološki podatki v Sloveniji. *Zdrav Vestn* 2006; 75: 555–560.
11. Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A. *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Tangram, 2002: 408–412.
12. Blejec T. Infekcije s herpesvirusi v nosečnosti. In: Bregant L. *Nebakterijske okužbe v perinatologiji*. Ljubljana: Društvo za pomoč prezgodaj rojenim otrokom, 1998: 26–28.
13. Sauerbrei A. Review of varicella-zoster virus infections in pregnant women and neonates. *Health* 2010; 2 (2): 143–152.
14. Lemos MC, Nero S, Bertagnon JR. Perinatal varicella. *Einstein* 2010; 8: 122–123.

15. Daley JA, Thorpe S, Garland MS. Varicella and the pregnant woman: Prevention and management. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2008; 48: 26–3.
16. Pass R, Weber T, Whitley RJ. Herpesvirus infections in pregnancy. USA: International Herpes Management Forum, 1999: 67–72.
17. Sauerbrei A, Wutzler P. Varicella-Zoster virus infections during pregnancy: epidemiology, clinical symptoms, diagnosis, prevention and therapy. *Current Pediatric Reviews* 2005; 1: 205–216.
18. Petrovec M. Okužbe z virusom varičela-zoster v nosečnosti. In: Golle A, Petrovec M. Okužbe v nosečnosti in obporodnem obdobju. Ljubljana: Med Razgl 2006; 45: Suppl 3: 109–114.
19. Lopez A, Bridges C, Schmid S, et.al. Varicella. In: Roush WS, McIntyre L, Baldy ML. *Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases*. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2008: 1–17.
20. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. New York: Lange Medical Books, 2001: 378–381.
21. Avšič Županc T, Poljak M. Razvoj diagnostičnih metod pri nebakterijskih okužbah. In: Bregant L. *Nebakterijske okužbe v perinatologiji*. Ljubljana: Društvo za pomoč prezgodaj rojenim otrokom, 1998: 17–25.
22. Jong DM, Well JFL, Schuurman T, et.al. Quantitation of Varicella-Zoster Virus DNA in Whole Blood, Plasma, and Serum by PCR and Electrochemiluminescence. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (7): 2568–2573.
23. Kido S, Ozaki T, Asada H, et.al. Detection of Varicella-Zoster Virus (VZV) DNA in Clinical Samples from Patients with VZV by the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29 (1): 76–79.
24. Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2008: 274–302.
25. Marin J. Neposredno dokazovanje virusov. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al. *Splošna medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2007: 109–118.
26. Folkers E, Vreeswijk J, Wagenaar F, et.al. Immunoelectron microscopy for rapid diagnosis of varicella-zoster virus in a complicated case of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (9): 2487-2491.

27. Avšič Županc T. Neposredno dokazovanje virusov. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2007: 119–128.
28. Simčič S. Uporaba imunoliških metod pri spoznavi bolezni. In: Kotnik V. Imunološki priročnik. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, 2010: 37–44.
29. Koren S. Virusna cepiva in imunski serumi. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2007: 155–170.
30. Zakotnik B, Čižman M. Nekatera novejša cepiva in indikacije za njihovo uporabo. In: Čižman M, Sterle F. Infektološki simpozij 1999. Ljubljana: Med Razgl 1999; 38: Suppl 2: 187–208.
31. Marin M, Güris D, Chaves S, et.al. Prevention of Varicella: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recommendations and Reports 2007; 56: 1–40.
32. Ahčan J, Čižman M, Pleterski-Rigler D, et.al. Ocena upravičenosti splošnega cepljenja otrok proti noricam v Sloveniji. Zdrav Vest 2002; 71: 667–672.
33. Koren S, Poljak M. Kemoterapija virusnih bolezni. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, et.al. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2007: 143–154.
34. Kroon S, Wood MJ. Management of varicella. USA: University of Alabama School of Medicine, Division of Continuing Medical Education and the IHMF, 1996: 13–24.
35. Tomažič J. Pasivna imunizacija. In: Čižman M, Sterle F. Infektološki simpozij 1999. Ljubljana: Med Razgl 1999; 38: Suppl 2: 177–185.
36. DiaSorin - LIAISON[®] VZV IgG (310850). Instructions for use. 2010. Saluggia, DiaSorin: 1–3.
37. SIEMENS - Enzygnost[®] Anti-VZV/IgG. Navodila proizvajalca. 2008. Marburg, SIEMENS: 1–10.
38. bioMérieux - VIDAS[®] Varicella-Zoster IgG. Navodila proizvajalca. 2004. Marcy-l'Etoile, bioMérieux: 1–6.
39. Marc J. Navodila in dnevnik za vaje iz klinične biokemije I. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2008: 33–35.
40. Maple PAC, Rathod P, Smit E, et.al. Comparison of the performance of the LIAISON VZV-IgG and VIDAS automated enzyme linked fluorescent immuno assays with reference to a VZV-IgG time-resolved fluorescence immunoassay and implications of choice of cut-off for LIAISON assay. J Clin Virology 2009; 44: 9–14.

41. Huynen P, Melin P, Mathieu J, De Mol P. LIAISON® VZV IgG and VZV IgM assays: A Comparative Study. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2007; 1–2.
42. Ory F, Echevarria JM, Kafatos G, et.al. European seroepidemiology network 2: Standardization of assays for seroepidemiology of varicella zoster virus. J Clin Virology 2006; 36 (2): 111–118.