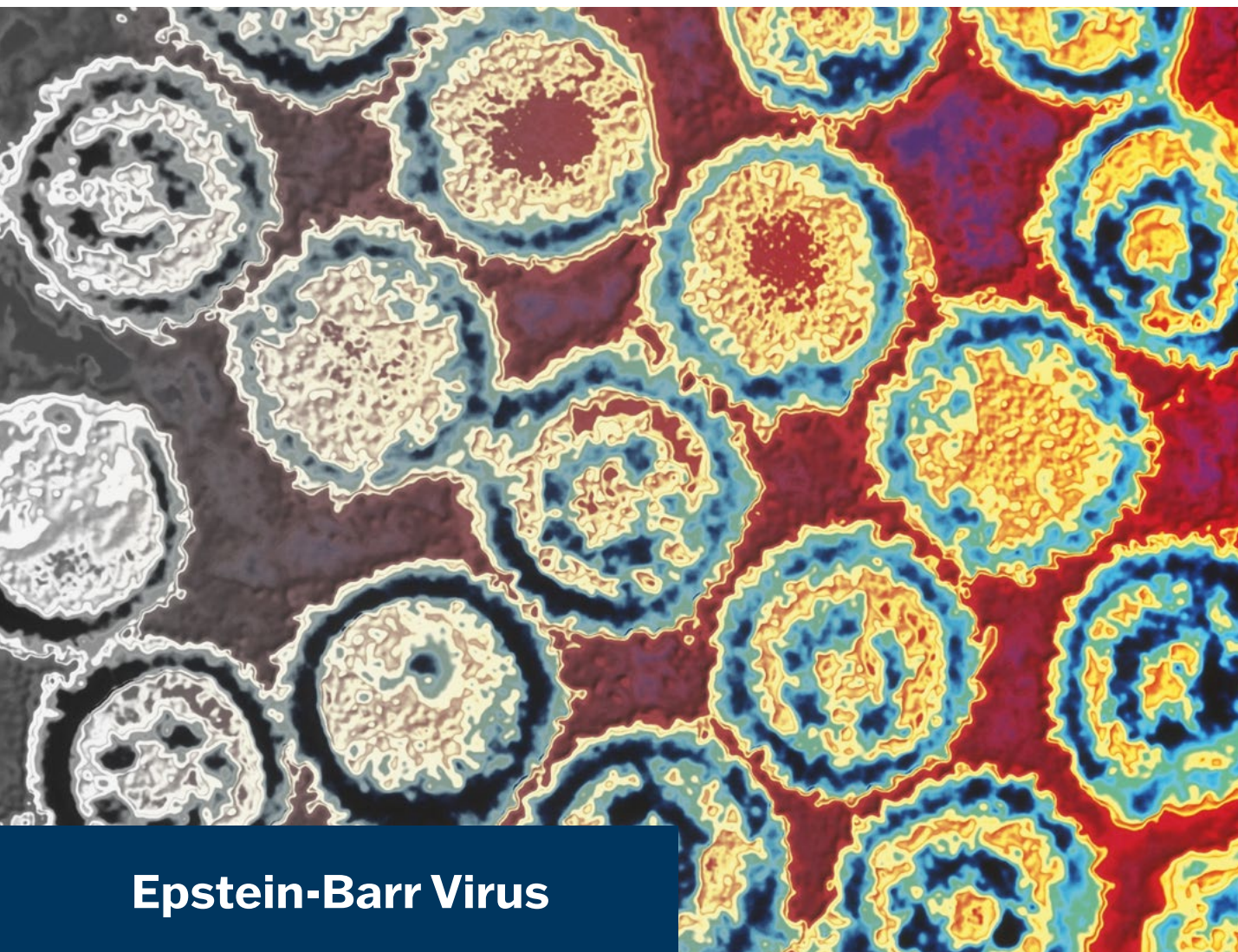




Epstein-Barr Virus

Imunoenzymatické soupravy k diagnostice infekční mononukleózy

ELISA, IMUNOBLOT a MICROBLLOT-ARRAY soupravy jsou určeny ke stanovení specifických protilátek třídy IgA, IgG a IgM v lidském séru, plazmě nebo mozkomíšním moku



Diagnostické soupravy jsou určeny
pro profesionální použití v laboratoři.



Úvod

Virus Epstein – Barrové (EBV) patří do skupiny herpetických virů (4. lidský herpetický virus, HHV4). Zdrojem infekce je nakažený člověk, přenos se děje kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem. Inkubační doba je 1–2 měsíce, 90 % nákaz proběhne v dětském věku. Infekce vyvolané EB virem způsobují onemocnění charakterizované horečkou, faryngitidou, generalizovaným zvětšením lymfatických uzlin. Projevy EB virózy jsou ovlivněny věkem a stavem imunitního systému organismu. EBV nevymizí z organismu úplně, přetrvává v latentním stavu a může se reaktivovat.

Diagnostika onemocnění

Pro diagnostiku onemocnění je důležitá anamnéza, klinický obraz a výsledky laboratorních testů. Vhodnou možností průkazu infekce a její fáze je stanovení specifických protilátek třídy IgA, IgG a IgM proti jednotlivým antigenům EBV v séru nebo plazmě metodou ELISA a konfirmačními metodami Immunoblot či Microblot-Array.

Klinické projevy infekce EBV

Primoinfekce

- Inaparentní průběh
- Nespecifické horečnaté onemocnění
- Infekční mononukleóza (angína, lymfadenopatie, splenomegalie, horečka)

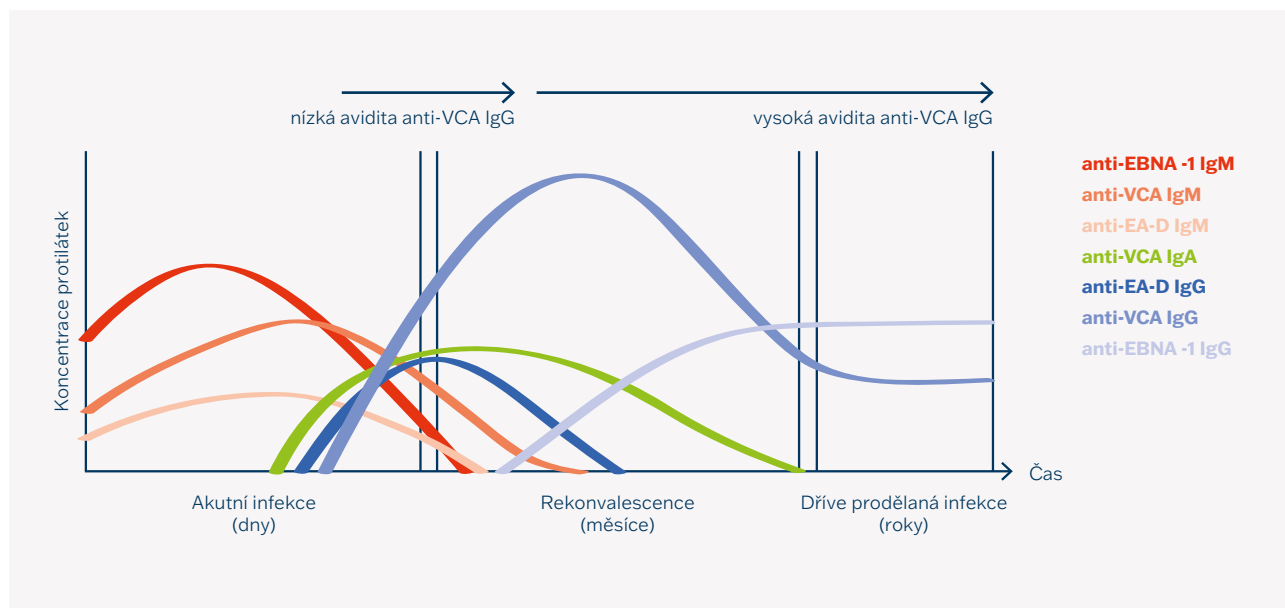
Latentní chronická infekce

- Asymptomatické vylučování viru slinami

Reaktivace

- Zpravidla asymptomatická
- U imunodeficitu: maligní lymfoproliferace, leukoplakie jazyka, lymfocytická intersticiální pneumonie atd.)
- V určitých geografických oblastech: Burkittův lymfom, nazofaryngeální karcinom

Protilátková odpověď dominantních antigenů



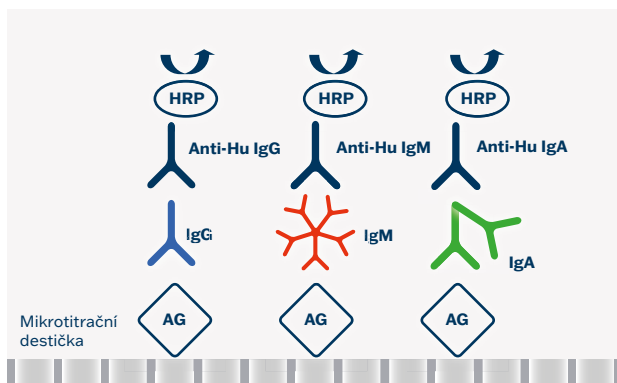
Specifické antigeny

<u>Antigen</u>	<u>Antigen</u>
EBNA-1	Epstein-Barr nuclear antigen 1; IgG: významný diagnostický marker pozdní fáze nebo reaktivace infekce; IgM: protilátky detekovatelné 2-4 měsíce po primární EBV infekci, mohou se vyskytovat i u reaktivace
EBNA-2	Epstein-Barr nuclear antigen 2; IgG: vysoké titry protilátek u chronické infekce nebo v postakutní fázi Absence IgG anti-EBNA-2 protilátek a současně přítomnost anti-EBNA-1 protilátek vylučuje primární infekci
VCA p18	Viral Capsid Antigen p18; IgA: marker primární infekce; ve vysokých titrech persistují u pacientů s nazofaryngeálním karcinomem IgM: indikátor primární infekce; mohou být přítomny i v průběhu reaktivace infekce IgG: Významný marker pozdní fáze infekce, protilátky se nevyskytují u primárních infekcí
VCA p23	Viral Capsid Antigen p23; Protilátky proti tomuto antigenu mohou být detekovány ve všech fázích infekce (IgG i IgM), v organismu dlouho přetrvávají
EA-D p54	Early Antigen Diffuse p54; BMRF1; IgA: produkované během primární infekce; vysoké titry u reaktivace; ve vysokých titrech persistují u pacientů s nazofaryngeálním karcinomem Doplňkový marker akutní EBV infekce, detekovatelný i v latentní fázi primární infekce (IgG i IgM)
EA-D p138	Early Antigen Diffuse p138; IgA: produkované během primární infekce; vysoké titry u reaktivace; ve vysokých titrech persistují u pacientů s nazofaryngeálním karcinomem Doplňkový marker akutní EBV infekce, detekovatelný i v latentní fázi primární infekce (IgG i IgM)
EA-R	Early Antigen Restricted protein p85; IgG: protilátky se obvykle vyskytují v pozdější fázi, během akutní fáze se prakticky nevyskytují s výjimkou dětí; vysoké hladiny u pacientů s reaktivací nebo u imunokompromitovaných pacientů
Rta	Replication and transcription Activator (BRLF1); Velmi časný antigen IgG: potenciální diagnostický marker nazofaryngeálního karcinomu
ZEBRA	Z Epstein-Barr replication activator protein; Trans-activator protein BZLF1; IgM: velmi časný indikátor akutní infekce; IgG: marker časného stadia, ale detekovatelný i v pozdních fázích infekce Sérologický marker EBV reaktivace, marker EBV-asociovaných onemocnění
gp85	Probable membrane antigen gp85 (BDLF3);
gp350	Epstein-Barr virus envelope glycoprotein gp350 (BLLF1); IgM: vysoké titry u pacientů s infekční mononukleózou IgG: nárůst titru až po několika měsících od primární infekce Specifická imunitní odpověď pro EBV-asociovaná onemocnění
LMP1	Latent membrane protein 1 Častý výskyt u latentních infekcí; Spojován s EBV-asociovanými malignitami (nazofaryngeální karcinom)

ELISA

Princip testu

Soupravy jsou založeny na sendvičovém typu ELISA metody



Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml)
	2. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl – blank = prázdná jamka
	3. Inkubace 30 min. při 37 °C
	4. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	5. Dávkování Konjugátu 100 µl – blank = prázdná jamka
	6. Inkubace 30 min. při 37 °C
	7. Odsátí a promytí jamek 5 krát
	8. Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl – včetně blanku
	9. Inkubace 30 min. při 37 °C
	10. Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl – včetně blanku
	11. Fotometrické měření při 450 nm

Antigeny

Rekombinantní antigeny s vysoce specifickými imunodominantními epitopy

Použití souprav

- Vyhledávací test k průkazu EBV infekce u člověka
- Diagnostika fáze onemocnění

Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním ředění
- Barevně odlišené reagentie
- Zaměnitelnost komponent
- Barevně značené stripky s odlamovacími jamkami
- CUT-OFF kontrola a kalibrátory
- Semikvantitativní hodnocení výsledků (Index positivity-IP) nebo kvantitativní vyhodnocení výsledků (U/ml)

Výhody souprav

- Vysoká diagnostická účinnost
- Dobrá reprodukovatelnost
- Vysoká dynamika testů
- Identický pracovní postup
- Celková doba vyšetření 1,5 hodiny
- Možnost kvantitativního stanovení
- Vhodné pro otevřené automatické systémy
- Aviditní test (EIA EBV VCA IgG)
- Stanovení v mozkomíšním moku (EIA EBV VCA)
- Možnost nezávislé verifikace (CKS)
- Komplexní zákaznický servis

Charakteristiky souprav

<u>ELISA</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
EIA EBV EA-D IgG	95,5 %	97,7 %
EIA EBV EA-D IgM	95,1 %	94,4 %
EIA EBV EBNA-1 IgG	96,9 %	98,9 %
EIA EBV EBNA-1 IgM	97,8 %	97,7 %
EIA EBV VCA IgA	97,7 %	97,9 %
EIA EBV VCA IgG	98,8 %	98,9 %
EIA EBV VCA IgM	98,6 %	98,4 %

Interpretace výsledků

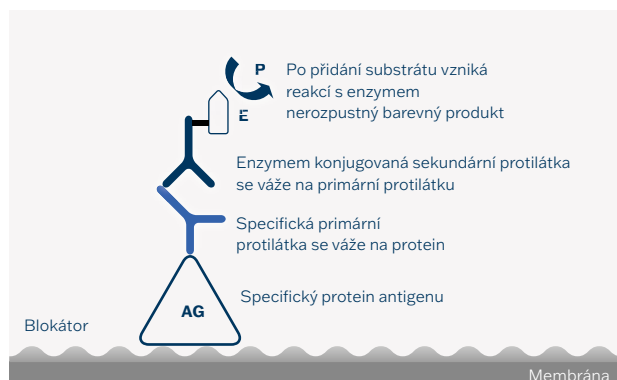
Modelové situace při vyhodnocování výsledků

<u>Hodnocení</u>	<u>VCA</u>			<u>EA-D</u>		<u>EBNA-1</u>	
	<u>IgM</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>
Seronegativita	-	-	-	-	-	-	-
Primární infekce	+	-	-	+	-	+	-
	+	+	-	+	+	(+)	-
	+	+	+	+	+	(+)	-
	+	(+)	+	-	(+)	-	-
Postakutní stádium	-	(+)	+	-	(+)	-	+
Dříve prodělaná infekce	-	-	+	-	-	-	+
Reaktivace	+	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+

IMUNOBLOT

Princip testu

Rekombinantní antigeny jsou přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí mikrodispensních metod.



Antigeny



EBNA-1 - Epstein-Barr nuclear antigen 1;
v IgG třídě významný diagnostický marker pozdní fáze nebo reaktivece infekce;

v IgM třídě detekovatelné protilátky 2-4 měsíce po primární EBV infekci, mohou se vyskytovat i u reaktivece

VCA-p18 - Viral Capsid Antigen p18; významný marker pozdní fáze infekce,
IgG protilátky se u primárních infekcí nevyskytují;

IgM protilátky mohou být detekovány i v časně fázi infekce

VCA-p23 - Viral Capsid Antigen p23; protilátky proti tomuto antigenu mohou být detekovány v IgG i IgM třídě ve všech fázích infekce,
IgG protilátky v organismu dlouho přetrvávají

EA-D - Early Antigen Diffuse p54; BMRF1; doplňkový marker akutní EBV infekce, protilátky detekovatelné v IgG i IgM třídě, a to i v pozdní fázi primární infekce

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
1.	Dávkování Univerzálního roztoku 2,5 ml
2.	Smáčení stripů 10 min. při laboratorní teplotě – třepačka
3.	Odsátí
4.	Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (30 µl + 1,5 ml)
5.	Dávkování kontrol a ředěných vzorků 1,5 ml
6.	Inkubace 30 min. při laboratorní teplotě – třepačka
7.	Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
8.	Dávkování Konjugátu 1,5 ml
9.	Inkubace 30 min. při laboratorní teplotě – třepačka
10.	Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 1,5 ml po 5 min. – třepačka
11.	Dávkování substrátu (BCIP/NBT) 1,5 ml
12.	Inkubace 15 min. při laboratorní teplotě – třepačka
13.	Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 2 ml po 5 min. – třepačka
14.	Nalepení a vyhodnocení stripů

Použití souprav

- Podrobné stanovení přítomnosti protilátek proti specifickým antigenům viru Epstein-Barrové
- Konfirmace sporných výsledků
- Konfirmační test ELISA vyšetření

Uživatelský komfort

- Komponenty v pracovním ředění
- Barevně odlišené stripy
- Zaměnitelnost komponent
- Negativní a Pozitivní kontrola
- Kontrolní linie na stripu
- Možnost softwarového vyhodnocení

Korelace metod

Srovnání se soupravami IMUNOBLOT

Počet korespondujících výsledků: 97,6 %

<u>BLOT-LINE EBV IgG</u>			
		negativní	pozitivní
referenční souprava	+	0	119
	-	40	4

Počet korespondujících výsledků: 92,5 %

<u>BLOT-LINE EBV IgM</u>			
		negativní	pozitivní
referenční souprava	+	3	38
	-	36	4

Srovnání se soupravami EIA

<u>Parametr</u>	<u>Celková shoda</u>
EBNA-1 IgG	92,2 %
VCA IgG	93,3 %
EA-D IgG	94,8 %

Charakteristiky souprav

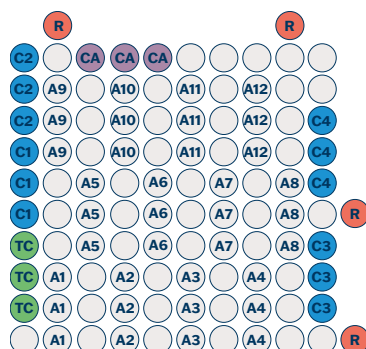
<u>Parametr</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
EBV IgA	95,4 %	96,6 %
EBV IgG	100,0 %	92,5 %
EBV IgM	92,7 %	95,7 %

Výhody souprav

- Identický pracovní postup
- Jednoduchá interpretace a reprodukovatelnost výsledků
- Sofistikovaný vyhodnocovací software
- Vysoká diagnostická účinnost
- Vhodné pro automatické systémy
- Komplexní zákaznický servis

MICROBLOT-ARRAY

Rozložení antigenů a kontrolních spotů



Popis antigenů

- A1** – EBNA-1
- A2** – EBNA-2
- A3** – VCA p18
- A4** – VCA p23
- A5** – EA-D p54
- A6** – EA-D p138
- A7** – EA-R
- A8** – Rta
- A9** – ZEBRA
- A10** – gp85
- A11** – gp350
- A12** – LMP1

Popis kontrolních spotů

- R** – Reference
- TC** – Test control
- CA** – Conjugate control IgA
- CG** – Conjugate control IgG
- CM** – Conjugate control IgM
- C1** – Calibration 1
- C2** – Calibration 2
- C3** – Calibration 3
- C4** – Calibration 4

Pracovní postup

Krok	Kroky testu
	1. Dávkování Univerzálního roztoku 150 µl
	2. Smáčení 10 min při laboratorní teplotě
	3. Odsátí
	4. Ředění vzorků – séra/plazmy 1:51 (10 µl + 500 µl)
	5. Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl
	6. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	7. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	8. Dávkování Konjugátu 100 µl
	9. Inkubace 30 min při laboratorní teplotě
	10. Odsátí a promytí v Univerzálním roztoku 3 krát 150 µl po 5 min
	11. Dávkování Substrátového roztoku (BCIP/NBT) 100 µl
	12. Inkubace 15 min při laboratorní teplotě
	13. Odsátí a promytí v destilované vodě 2 krát 200 µl po 5 min
	14. Vysušení a vyhodnocení

Uživatelský komfort

- Nízká spotřeba vzorku
- Antigeny spotovány v tripletu - minimalizace chyby provedení
- Plně automatické zpracování a vyhodnocení výsledků pomocí intenzity spotů (AU), pomocí IP či kvantitativní (U/ml)
- Paralelní vyšetření více markerů současně
- Vysoká citlivost

Charakteristiky souprav

<u>Patogen</u>	<u>Diagnostická citlivost</u>	<u>Diagnostická specifita</u>
EBV IgA	98,3 %	96,7 %
EBV IgG	98,8 %	95,0 %
EBV IgM	96,4 %	92,9 %

Korelace metod

Srovnání se soupravami EIA



Reaktivita v různých stádiích onemocnění EBV

		<u>Klinická klasifikace vzorku</u>				
		Seronegativní (n=18)	Primoinfekce (n=43)	Postaktutní infekce (n=34)	Dříve prodělaná infekce (n=135)	Reaktivace (n=17)
MBA EBV IgM	pos	0 (0%)	42 (98%)	5 (15%)	4 (3%)	12 (71%)
	co	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	3 (2%)	1 (6%)
	neg	18 (100%)	1 (0%)	28 (82%)	128 (95%)	4 (23%)
MBA EBV IgG	pos	0 (0%)	36 (84%)*	34 (100%)	135 (100%)	17 (100%)
	co	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	neg	18 (100%)	7 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
MBA EBV IgA	pos	0 (0 %)	17 (39%)	24 (18%)	15 (44%)	4 (23%)
	co	0 (0%)	2 (5%)	10 (7%)	4 (12%)	2 (12%)
	neg	18 (100 %)	24 (56%)	101 (75%)	15 (44%)	2 (12%)

Frekvence záchytu anti-EBV protilátek na klinicky definovaných panelech

		<u>séronegativní</u> <u>(n=18)</u>	<u>primární</u> <u>infekce</u> <u>(n=43)</u>	<u>postakutní</u> <u>stádium</u> <u>(n=34)</u>	<u>dříve prodělaná</u> <u>infekce</u> <u>(n=135)</u>	<u>reaktivace</u> <u>(n=17)</u>
EBNA-1	IgM	0 (0%)	11 (26%)	1 (3%)	3 (2%)	3 (18%)
	IgG	0 (0%)	3 (7%)	31 (91%)	131 (97%)	15 (88%)
	IgA	0 (0%)	0 (0%)	2 (6%)	4 (3%)	0 (0%)
VCA p23	IgM	0 (0%)	5 (12%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)
	IgG	0 (0%)	10 (23%)	27 (79%)	90 (67%)	9 (53%)
	IgA	0 (0%)	4 (12%)	0 (0%)	4 (12%)	1 (6%)
VCA p18	IgM	0 (0%)	36 (84%)	1 (3%)	1 (1%)	11 (65%)
	IgG	0 (0%)	18 (42%)	30(88%)	130 (96%)	15 (88%)
	IgA	0 (0%)	10 (29%)	3 (7%)	10 (29%)	3 (18%)
EA-D p54	IgM	0 (0%)	17 (40%)	2 (6%)	1 (1%)	3 (18%)
	IgG	0 (0%)	21 (49%)	18 (53%)	9 (7%)	2 (12%)
	IgA	0 (0%)	9 (21%)	5 (15%)	2 (1%)	1 (6%)
EA-D p138	IgM	0 (0%)	2 (5%)	1 (3%)	0 (0%)	1 (6%)
	IgG	0 (0%)	4 (9%)	10 (29%)	1 (1%)	2 (12%)
	IgA	0 (0%)	3 (7%)	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)
EA-R p85	IgM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgG	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (1%)	0 (0%)
	IgA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
gp85	IgM	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)
	IgG	0 (0%)	0 (0%)	5 (15%)	11 (8%)	2 (12%)
	IgA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)
Rta	IgM	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgG	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgA	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)
EBNA-2	IgM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgG	0 (0%)	5 (12%)	12 (35%)	32 (24%)	0 (0%)
	IgA	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (1%)	0 (0%)
ZEBRA	IgM	0 (0%)	8 (19%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)
	IgG	0 (0%)	19 (44%)	22 (65%)	52 (39%)	5 (29%)
	IgA	0 (0%)	8 (19%)	3 (9%)	5 (4%)	0 (0%)
gp350	IgM	0 (0%)	4 (9%)	0 (0%)	2 (1%)	1 (6%)
	IgG	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (4%)	0 (0%)
	IgA	0 (0%)	2 (5%)	2 (6%)	3 (2%)	0 (0%)
LMP1	IgM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgG	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	IgA	0 (0%)	0 (0%)	3 (9%)	3 (2%)	0 (0%)

Objednací údaje

ELISA

Kód	Název soupravy	Počet testů
EAG096	EIA EBV EA-D IgG	96
EAM096	EIA EBV EA-D IgM	96
EBG096	EIA EBV EBNA-1 IgG	96
EBM096	EIA EBV EBNA-1 IgM	96
VCA096	EIA EBV VCA IgA	96
VCG096	EIA EBV VCA IgG	96
VCM096	EIA EBV VCA IgM	96
SK-EAG096	SmartEIA EBV EA-D IgG	96
SK-EAM096	SmartEIA EBV EA-D IgM	96
SK-EBG096	SmartEIA EBV EBNA-1 IgG	96
SK-EBM096	SmartEIA EBV EBNA-1 IgM	96
SK-VCA096	SmartEIA EBV VCA IgA	96
SK-VCG096	SmartEIA EBV VCA IgG	96
SK-VCM096	SmartEIA EBV VCA IgM	96

Soupravy SmartEIA jsou koncipovány pro automatické zpracování na přístroji Agility.

IMUNOBLOT

Kód	Název soupravy	Počet testů
EBAL20	BLOT-LINE EBV IgA	20
EBGL20	BLOT-LINE EBV IgG	20
EBML20	BLOT-LINE EBV IgM	20
BD-EBGL24	BlueBLOT-LINE EBV IgG	24
BD-EBML24	BlueBLOT-LINE EBV IgM	24

Soupravy BlueBLOT-LINE jsou koncipovány pro automatické zpracování na přístroji BlueDiver.

MICROBLOT-ARRAY

Kód	Název soupravy	Počet testů
EBAMA96	Microblot-Array EBV IgA	96
EBGMA96	Microblot-Array EBV IgG	96
EBMMA96	Microblot-Array EBV IgM	96

**TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**

Křižíkova 188/68, 612 00 Brno, Česká republika
+420 549 121 205 (209, 238)
trade@testlinecd.com
www.testlinecd.cz



TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
je držitelem certifikátů
ISO 9001 a ISO 13485