



ZKUŠENOSTI SE STANOVENÍM AVIDITY PROTILÁTEK TŘÍDY IgG PROTI ZARDĚNKÁM V ELISA

J. Raszka, J. Januška, P. Červenka, M. Švajdová, H. Rulišková, H. Zelená
Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Odbor mikrobiologie a parazitologie, Virologické oddělení

ÚVOD

Zarděnky jsou benigní virové exantematické onemocnění. Infekce je však nebezpečná, pokud dojde k naze těhotné ženy v prvním trimestru těhotenství, vzhledem k možnosti přenosu nákazy na plod, s rizikem jeho těžkého postižení. Sérologicky potvrzená diagnóza rubeoly je indikací k interrupci.

HODNOCENÍ SÉROLOGICKÉHO VÝSLEDKU

Dosud bylo hodnocení sérologických výsledků založeno na posouzení dynamiky tvorby a přítomnosti protilátek třídy IgG a IgM. Průkaz IgM protilátek nemusí být vždy rozhodující, protože jejich tvorba je ovlivněna řadou faktorů. Přítomnost IgM protilátek, která nesouvisí s nálezem zarděnkami, může být detekována jako reakce organismu na jinou probíhající infekci, kupříkladu nákazu EBV. Je pak velmi obtížné rozhodnout, zda je nález IgM protilátek výrazem primoinfekce. Na druhé straně můžeme odřízet negativní výsledek testu, jednak z důvodu nedostatečné tvorby IgM protilátek nebo pozdního odběru prvního vzorku krve, kdy může dojít k poklesu hladiny IgM protilátek na nedetekovatelnou hodnotu. Řešením problému může být paralelní stanovení avidity protilátek třídy IgG.

AVIDITA PROTILÁTEK TŘÍDY IgG

Avidita protilátek je obecný imunologický pojem, který vyjadřuje pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou, a je užíván k popsání úrovně rezistence komplexu antigen-protilátka k působení denaturujících agens. Na začátku imunitní odpovědi tvoří organismus velké množství protilátek proti různým epitopům antigenu a jejich afinita (přilnavost) k těmto vazebným místům je různá. Souhrnně označujeme pevnost této vazby termínem avidita. V první fázi infekce je její hodnota nízká. Vytrávání imunitní odpovědi má za následek tvorbu plazmatických buněk, které tvoří protilátky cíleněji a zároveň dochází ke kompetici o antigen. Protilátky s vyšší afinitou vychytávají antigen snáze a rychleji. To se v konečném důsledku projevuje vzestupem avidity protilátek v pozdější fázi infekce.

V akutním období infekce je avidita protilátek nízká a postupně narůstá. V latentní fázi onemocnění jsou protilátky vysoce avidní a pokud dojde k reinfekci, tvoří paměťové buňky přímo protilátky s vyšší aviditou.

Principem stanovení avidity je zjištění, do jaké míry naruší denaturační činidlo (v našem případě urea) pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. Protilátky s nízkou afinitou jsou z vazby na antigen působením činidla uvolněny a odstraněny promývacím cyklem. Protilátky s vyšší afinitou odolávají působení denaturačního činidla a z vazby se tak snadno neuvolní.

METODIKA

Stanovení avidity IgG protilátek bylo provedeno enzymovou imunoanalýzou dg setem firmy Sorin. Dle návodu výrobce se séra pacientů testují paralelně ve dvou jamkách soupravy. Po první inkubaci a navázání na antigen se na jednu jamku nechá působit po přesně stanovený čas (5 minut) denaturační činidlo (8 mol/l urea), zatímco druhá jamka je ponechána prázdná. Na konci testu porovnáváme naměřenou absorbanční u jamky s ureou a bez ury. Přítomnost nízkavidních protilátek se projeví výrazným snížením absorbanční po opraování ureou (v promývacím cyklu došlo k jejich odmytí). Výsledek vyjadřujeme jako podíl absorbanční jamky s ureou a neopracované jamky. Vypočtený podíl násobený stem vyjadřuje hodnotu avidity v procentech. Hodnota cut – off pro aviditu IgG protilátek je výrobcem udávána 55%, do šedé zóny zahrnujeme hodnoty mezi 45 – 65%. Nález hodnot nižších než 45% svědčí pro čerstvou nákazu (méně než 4 měsíce), hodnoty vyšší než 65% informují o pozdní infekci (starší 4 měsíců) nebo o reinfekci.

VÝSLEDKY

V našem příspěvku jsou zpracovány výsledky vyšetření z období epidemie zarděnek, která proběhla v Moravskoslezském kraji v období od září roku 2001 do srpna 2002. V průběhu epidemie bylo na našem oddělení vyšetřeno celkem 2.564 vzorků od osob se suspektním onemocněním zarděnkami. Časové rozvrstvení je patrné z grafu č. 1.

Byly sestaveny dva soubory vzorků: pacientů s přítomností IgM protilátek a pacientů bez protilátek třídy IgM. V těchto souborech jsme srovnali závislost % avidity IgG na hodnotách absorbanční IgG jednotlivých pacientů. Oblast šedé zóny avidity IgG je vyznačena na grafech tmavším pozadím.

První soubor - graf č. 2 ilustruje závislost avidity protilátek IgG na absorbanční v testu IgG u 225 sér pacientů s nálezem IgG a IgM protilátek. Je možno říci, že se vzrůstající hodnotou absorbanční IgG dochází k vzestupu indexu avidity. Protože se však jedná o soubor osob s nálezem IgM protilátek, nachází se převážná většina hodnot indexu avidity v oblasti do 45%.

V dalším souboru - graf č. 3 jsme srovnávali výsledky u 159 vzorků s nálezem IgG protilátek bez přítomnosti IgM protilátek. Tady vidíme, že většina hodnot se nachází ve vyšší hladině a se vzrůstající absorbanční testu IgG protilátek stoupá i hodnota indexu avidity.

Distribuci avidity IgG protilátek u IgM pozitivních osob ukazuje graf č. 4, u osob bez protilátek IgM graf č. 5.

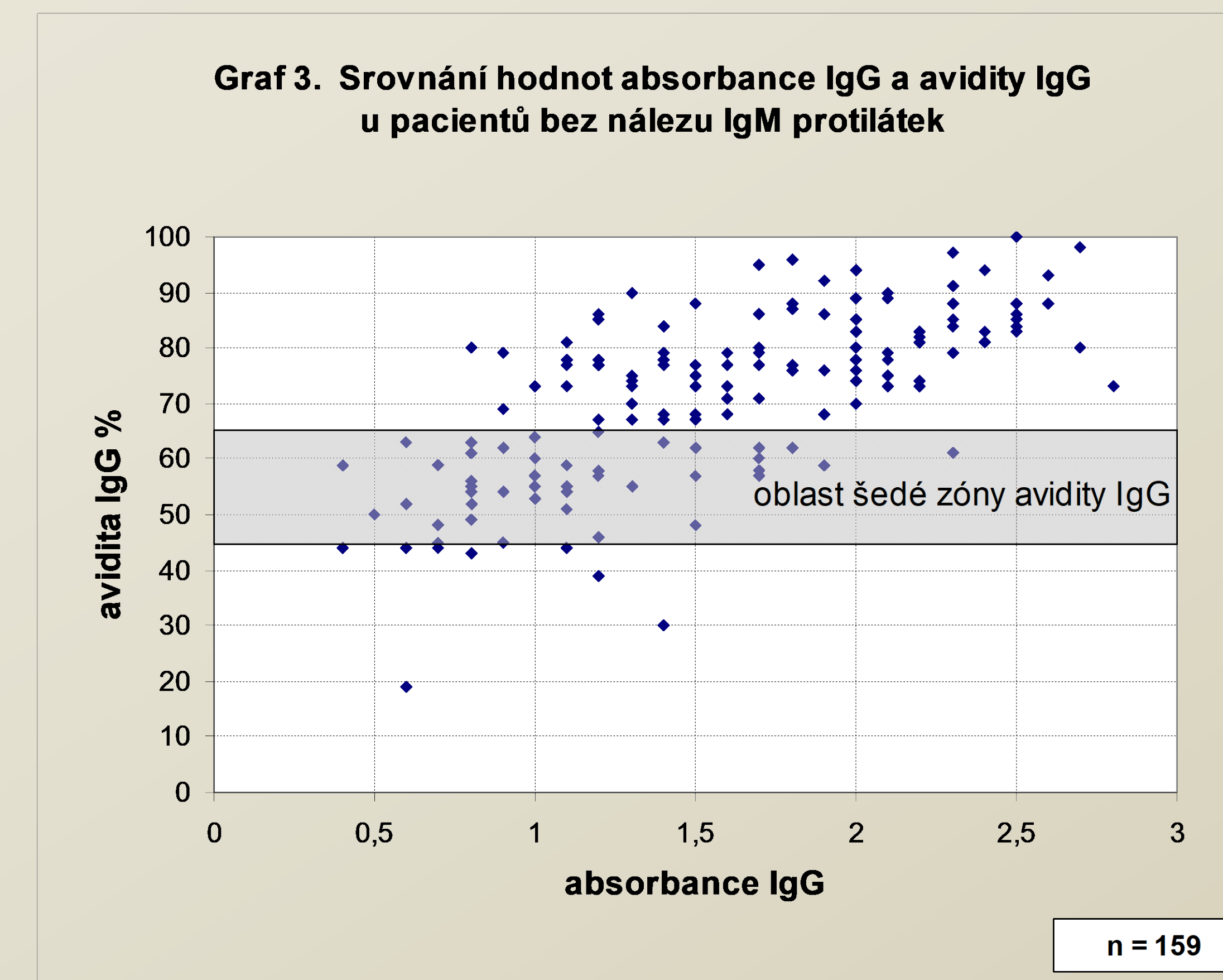
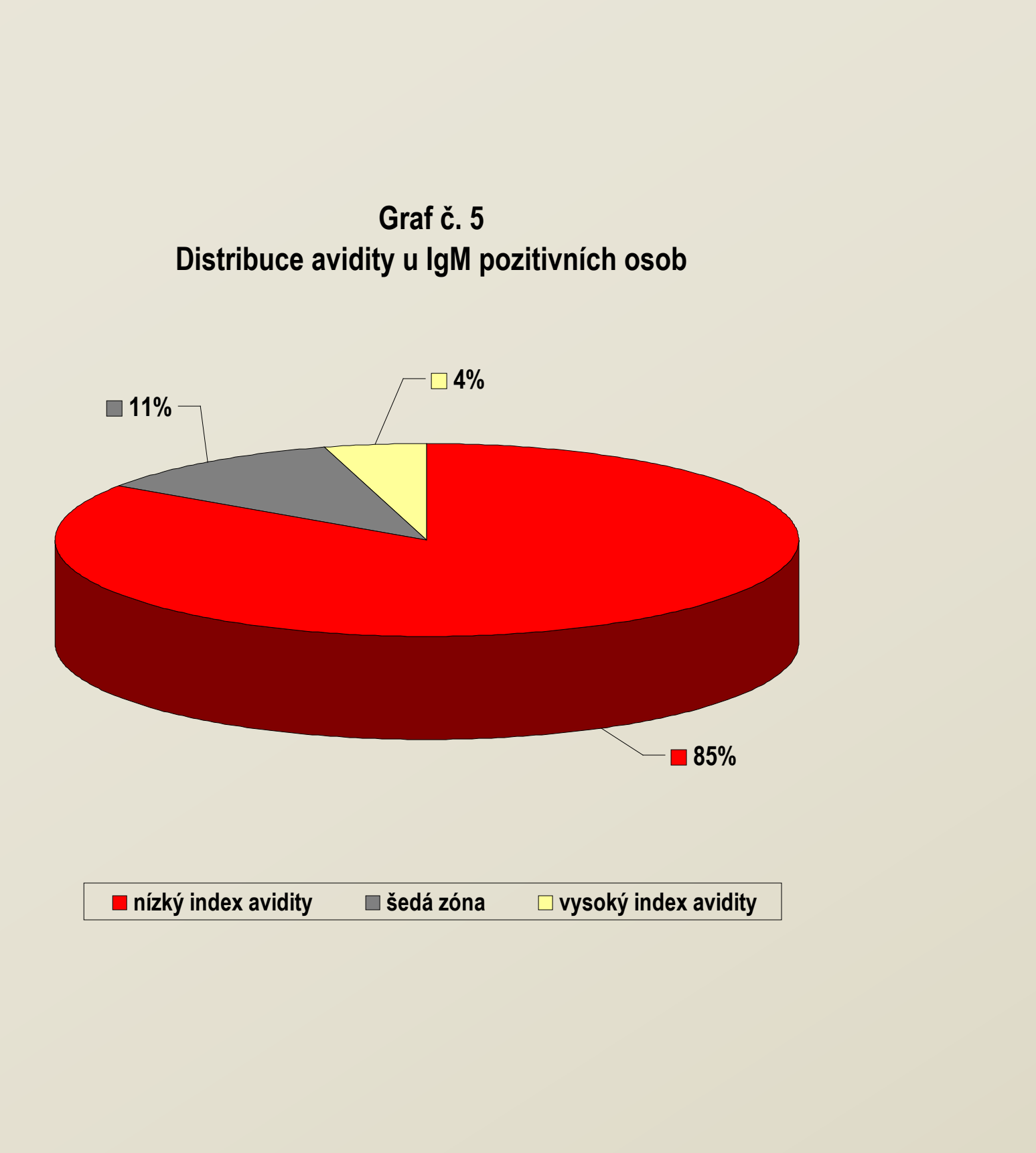
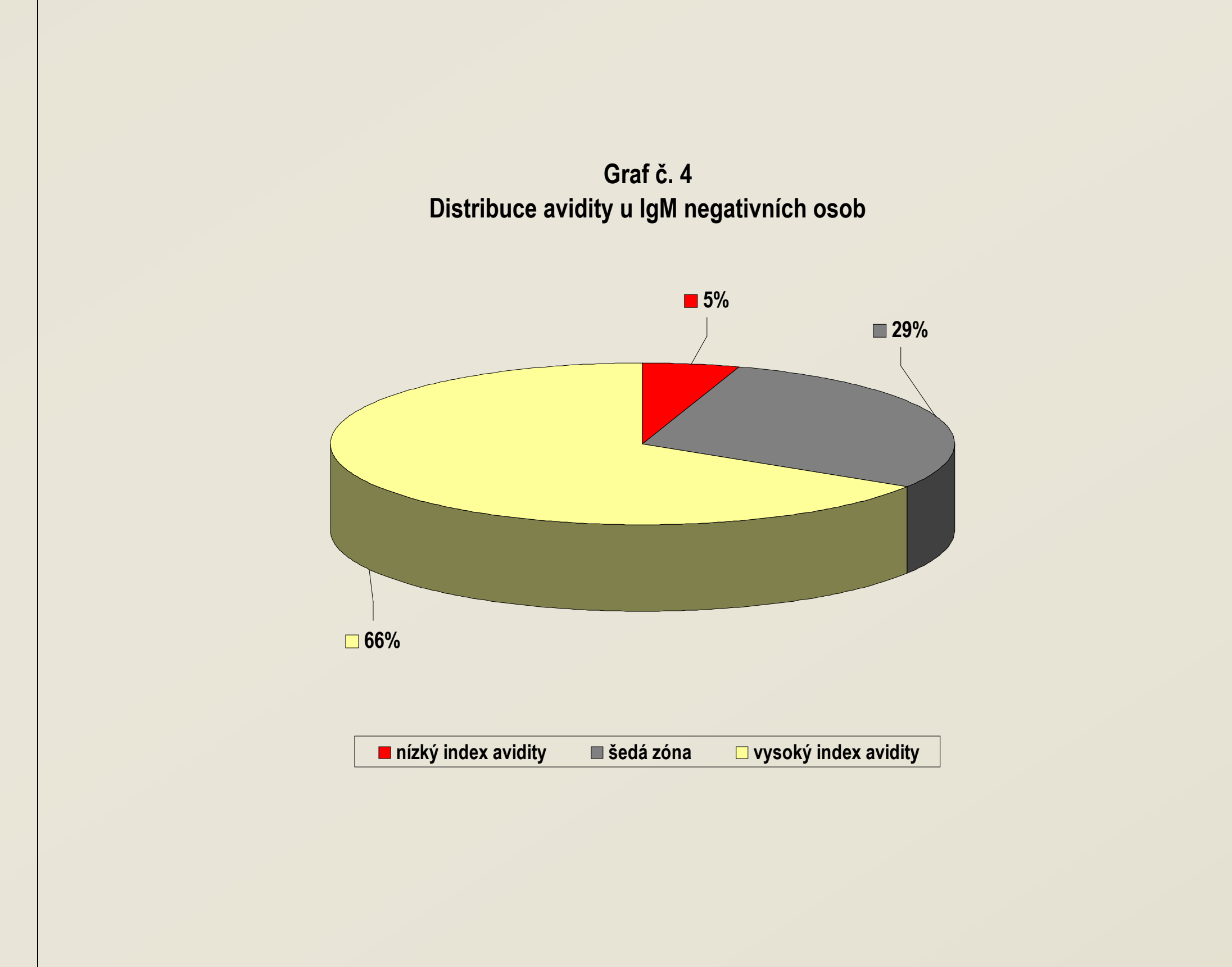
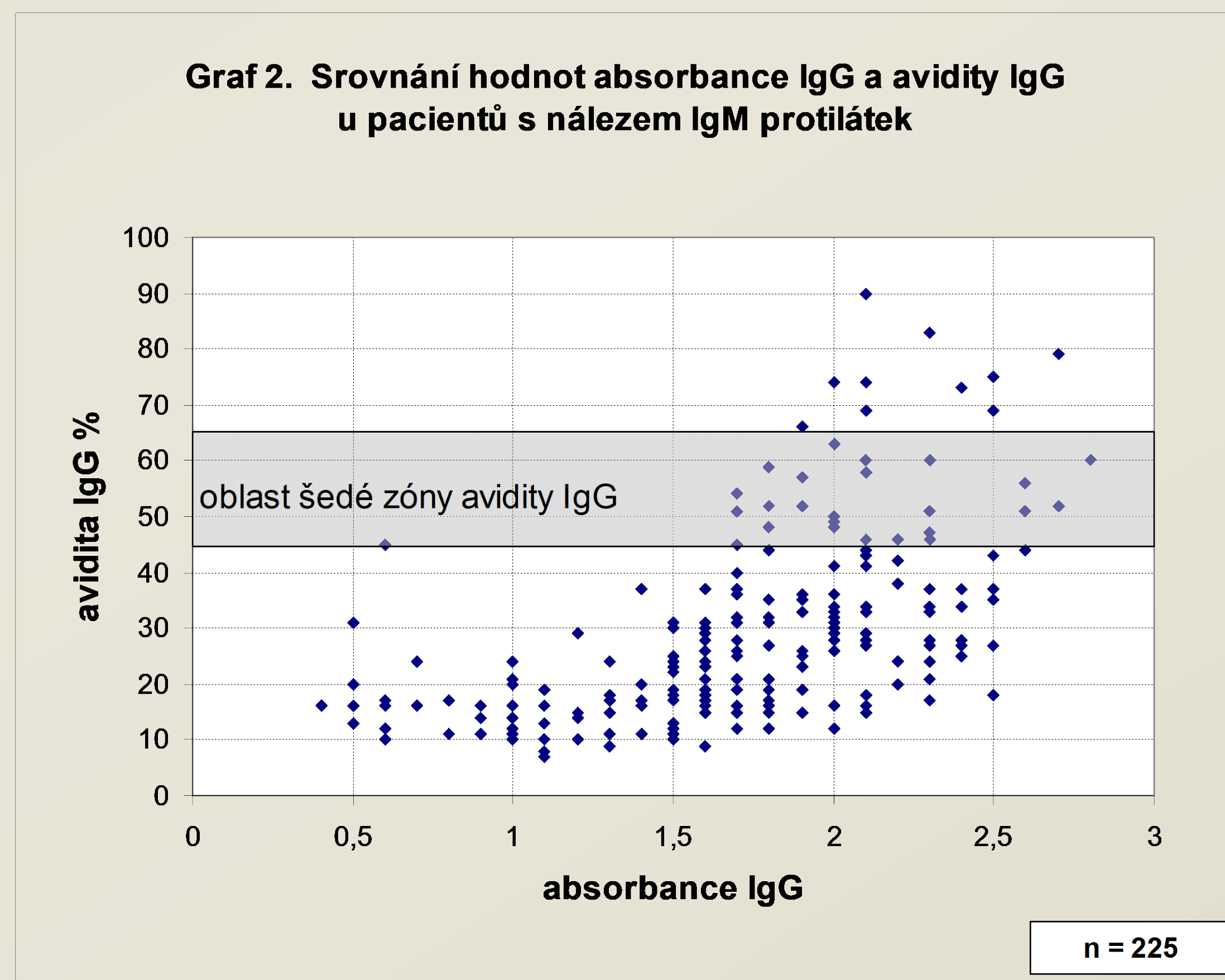
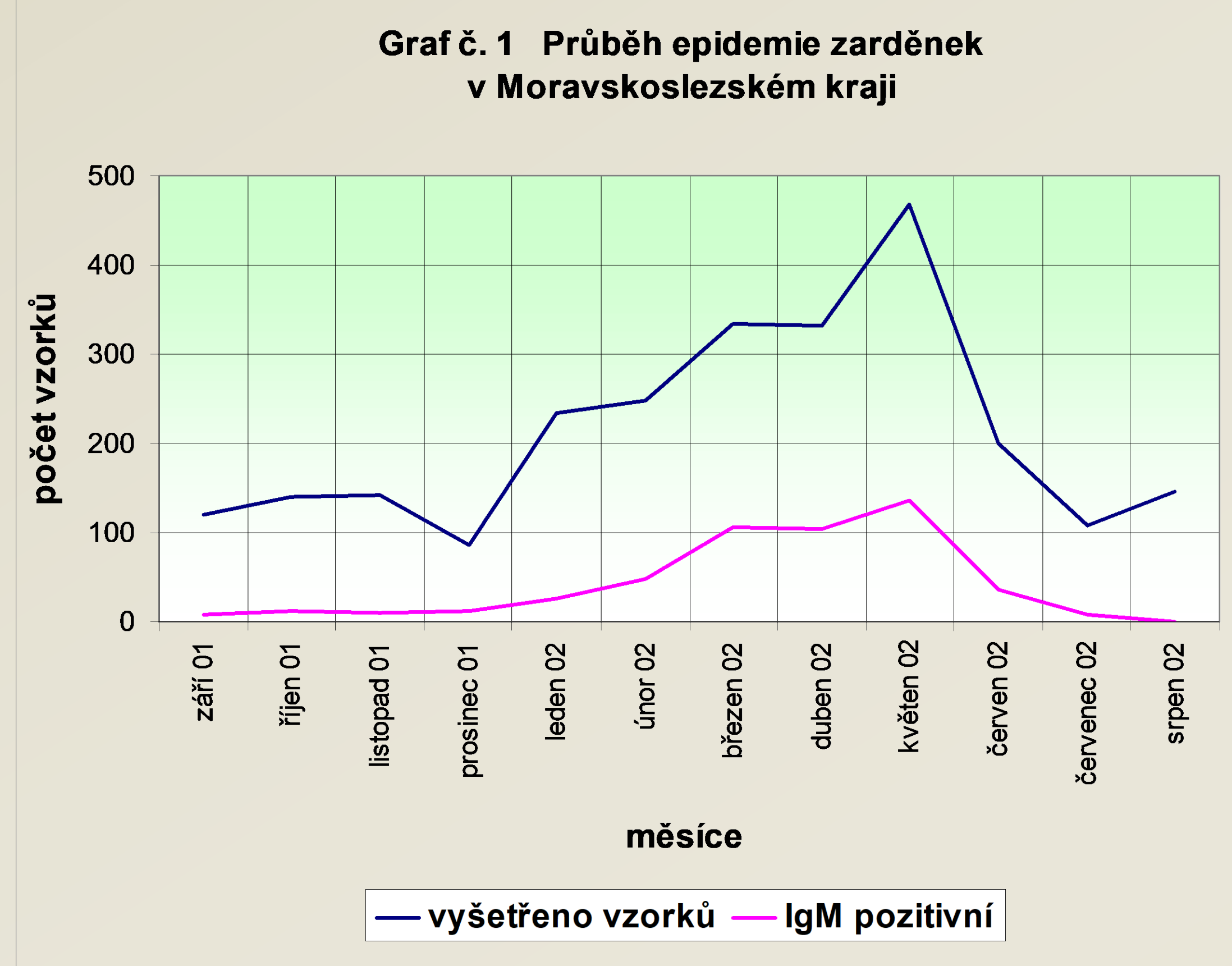
V tabulce č. 1 je uvedena dynamika tvorby avidních protilátek u pěti pacientů, u kterých byl proveden opakovaný odběr.

LITERATURA

- Bauer, G.: IgM: Ein variabler mehrdeutiger Marker. Mikrobiologie 6. Jg.: 44-51 (1996).
- Enders, G., Knotek, F.: Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary and rubella reinfection. Infection 17: 218-226 (1989).
- Hedmann, K., Rousseau, S.A.: Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary Rubella. Journal of Medical Virology 27: 288-292 (1989).
- Mauracher, C.A., Mitchell, L.A., Tingle, A.J.: Differential IgG avidity to rubella virus structural proteins. Journal of Medical Virology 36: 202-208 (1992).
- Thomas, U.I.J., Morgan-Capner, P., Roberts, A., Hesketh, L.: Persistent

Rubella-specific - IgM reactivity in the absence of recent primary Rubella and Rubella reinfection. Journal of Medical Virology 36: 188-192 (1992).

- Thomas, U.I.J., Morgan-Capner, P., Enders, G., O'Shea, S., Caidicott, D., Best, J.M.: Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary Rubella. Journal of Virological Methods 39: 149-155 (1992).
- Validation of an enzyme immunoassay for the detection of low avidity IgG, as a marker of CMV infection. M.P.Landini Dip. di Medicina Clinica Specialistica e sperimentale, Sez. di Microbiologia, Univ. degli Studi di Bologna, Policlinico S. Orsola, Bologna.
- B. Bottiger, I. Panum Jensen: Maturation of rubella IgG avidity over time after acute rubella infection. Clinical and Diagnostic Virology 8: 105-111, 1997



Tabulka č. 1			
DYNAMIKA TVORBY ZARDĚNKOVÝCH PROTILÁTEK U PACIENTŮ S OPAKOVANÝM ODBĚREM			
Číslo vzorku	4486		
Datum odběru	26.2.2002	8.3.2002	15.3.2002
Index pozitivity IgG	negativní	3,7	3,3
Avidita IgG	negativní	6%	17%
Index pozitivity IgM	negativní	8,6	8,0
Číslo vzorku	7957		
Datum odběru	8.4.2002	19.4.2002	14.5.2002
Index pozitivity IgG	negativní	3,9	4,3
Avidita IgG	negativní	22%	54%
Index pozitivity IgM	negativní	6,2	3,2
Číslo vzorku	9336		
Datum odběru	26.4.2002	6.5.2002	16.5.2002
Index pozitivity IgG	negativní	4,2	4,3
Avidita IgG	negativní	33%	40%
Index pozitivity IgM	negativní	7,8	8,8
Číslo vzorku	11505		
Datum odběru	28.5.2002	11.6.2002	11.7.2002
Index pozitivity IgG	negativní	5,7	6,4
Avidita IgG	negativní	29%	61%
Index pozitivity IgM	negativní	8,9	4,8
Číslo vzorku	13203		
Datum odběru	19.6.2002	21.6.2002	1.7.2002
Index pozitivity IgG	negativní	2,0	5,0
Avidita IgG	negativní	12%	25%
Index pozitivity IgM	negativní	5,4	6,0

ZÁVĚR

Naše zkušenosti se stanovením avidity specifických protilátek třídy IgG v období epidemie zarděnek potvrdily předpoklad, že metoda je vhodná rovněž pro laboratorní diagnostiku zarděnek. Stanovení avidity protilátek IgG doplňuje sérologickou diagnostiku zarděnek, umožňuje přesnější stanovení recentní nákazy, hodnocení výsledku má jednoznačně vyšší validitu.