

Szybki test do jakościowego i półilościowego wykrywania heterofilnych przeciwciał przeciwko mononukleozie w surowicy lub osoczu metodą aglutynacji cząstek lateksu na kartach.

Monogen jest pomocny przy diagnozowaniu zakażeń mononukleozą.

Informacje podstawowe

Mononukleozą (IM) jest ostrą chorobą zakaźną o etiologii wirusowej.

Najczęstszymi symptomami są gorączka, ból gardła, limfadenopatia, jądłowstręt, złe samopoczucie oraz mięśniobóle. U większości pacjentów występuje powiększenie śledziny. Wysypka plamiasta, plamiasto-grudkowa lub wybroczynowa pojawia się maksymalnie w 50% przypadków, ale ten objaw najczęściej ujawnia się u pacjentów leczonych ampicyliną.

Komplikacje w przebiegu IM mogą obejmować wtórne bakteryjne zapalenie gardła, pęknięcie śledziny, autoimmunologiczną anemię hemolityczną, autoimmunologiczną małopłytkowość, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie wątroby i powikłania ze strony centralnego układu nerwowego w postaci zapalenia opon i mózgu lub poprzecznego zapalenia rdzenia. Piorunująca śmiertelna postać IM lub nabyta hypogammaglobulinemia są rzadko spotykane.

Postawienie diagnozy tylko w oparciu o historię choroby i objawy jest niezwykle trudne. Przytacza się wiele przypadków w których IM została źle zróżnicowana od niespokrewnionych chorób wirusowych lub bakteryjnych (1). Z tego powodu testy hematologiczne i serologiczne są bardzo przydatne przy diagnozowaniu.

W 1932, Paul i Bunnell (2) donieśli, że surowica pacjentów z mononukleozą wykazuje wysoki miano heterofilnych przeciwciał przeciwko erytrocytom owcy. Opisano również aglutynację czerwonych krwinek innych ssaków (3,4). Białka odpowiedzialne za tą aglutynację są glikoproteinami osłonki erytrocytów i przez wielu autorów nazywane są antygenem Paul-Bunnell. Badania nad tymi glikoproteinami dowiodły, że wyizolowane z erytrocytów bydłęcych są najbardziej czułe na heterofilne przeciwciała przeciwko IM. Heterofilne przeciwciała przeciwko erytrocytom owczym (różne od tych, które występują w czasie mononukleozy) mogą być również wykrywane w surowicy zdrowych osób, które przyjmowały zastrzyki z surowicy (3,5).

Tradycyjnie heterofilne przeciwciała przeciwko IM są oddzielane od innych przeciwciał heterofilnych metodą różnicującej absorpcji (6,7) przy użyciu czerwonych krwinek wołowych i tkanki nerek świnki morskiej. Użycie wysoko oczyszczonego antygeny Paul-Bunnell'a związanego z cząstkami lateksu daje prostą, wysoce czułą metodę wykrywania specyficznych heterofilnych przeciwciał przeciwko IM.

W 1968 roku został opisany czynnik etiologiczny wywołujący IM (8). Został on nazwany wirusem Epstein-Baara (EBV) i należy do grupy herpeswirusów. W następstwie rozwinęło się wiele technik serologicznych obejmujących antygeny związane z EBV.

Transmisja IM najprawdopodobniej odbywa się poprzez intymny pocałunek, zanieczyszczone śliną naczynia na żywność i drogą kropelkową (9).

Zasada metody

Odczynnik **monogen** jest zawiesiną jednorodnych cząsteczek polistyrenowego lateksu opłaszczonych wysokoczyszczonym antygenem Paul-Bunnell otrzymanym z błony komórkowej erytrocytów wołowych. Stopień oczyszczenia antygeny jest taki, że **monogen** reaguje tylko z heterofilnymi przeciwciałami przeciwko IM. Z tego powodu nie jest konieczna różnicująca absorpcja.

Cząsteczki lateksu pozwalają na wizualizację reakcji antygen-przeciwciała. Jeżeli w próbce znajdują się heterofilne przeciwciała przeciwko IM, to jednorodna zawiesina lateksu zmienia swój wygląd i pojawia się wyraźna aglutynacja.

Odczynniki

- Odczynnik lateksowy:

Zawiesina cząsteczek polistyrenowego lateksu opłaszczonych antygenem Paul-Bunnell w buforze. Zawiera < 0.1% azydku sodu.

- Kontrola dodatnia:

Rozcieńczone buforem królicze IgG przeciwko antygenowi Paul-Bunnell. Zawiera < 0.1% azydku sodu

- Kontrola ujemna:

Rozcieńczona, niereaktywna surowica ludzka. Zawiera < 0.1% azydku sodu

Środki ostrożności

monogen jest testem do diagnostyki IN VITRO.

Jako konserwanta użyto azydku sodu. Azydek sodu może reagować z metalową instalacją kanalizacyjną, tworząc wybuchowe związki. Po wylaniu odczynnika, należy go obficie spłukać wodą.

Każdy materiał pochodzenia ludzkiego użyty do przygotowania odczynników został przebadany metodami zatwierdzonymi przez FDA w kierunku obecności HIV 1/2 i przeciwciał przeciwko HCV a także w kierunku HbsAg. Wszystkie wyniki były ujemne.

UWAGA: MATERIAŁ POTENCJALNIE ZAKAŹNY

Ponieważ żadna metoda nie daje całkowitej pewności braku czynników zakaźnych, odczynnikami należy posługiwać się z należytą ostrożnością (10).

Zużyty materiał należy usuwać do odpowiedniego pojemnika na odpady zakaźne.

Przechowywanie

Odczynniki wykazują stabilność do daty ważności podanej na etykiecie, jeśli są przechowywane w temp. 2 - 8°C. Nie zamrażać. Odczynniki mogą ulec zniszczeniu na skutek nieprawidłowego obchodzenia się nimi, a głównie z powodu narażenia na ekstremalne temperatury.

Odczynnik lateksowy, musi po zamieszaniu utworzyć jednorodną zawiesinę, bez widocznych skupisk. Podczas przechowywania może powstać niewielki osad, co jest normalne.

Nie używać odczynników z widocznym zanieczyszczeniem.

Zakraplacz dozuje krople o objętości 28 μ l \pm 10%. Należy go trzymać pionowo w stosunku do karty i pozwolić na spłynięcie tylko jednej kropli.

Dostępne opakowania

- Nr kat. 3000-1001, zestaw na 50 testów
1 x 1,4ml odczynnika, 1ml kontroli dodatniej, 1ml kontroli ujemnej, 9x6 jednorazowych kart
- Nr kat. 3000-1002, zestaw na 150 testów
3x1,4ml odczynnika, 2ml kontroli dodatniej, 2ml kontroli ujemnej, 27x6 jednorazowych kart

Materiał potrzebny, ale nie dostarczony

Sól fizjologiczna (0.9% NaCl, tylko do testu półilościowego), automatyczne pipety, wytrząsarka, patyczki, stoper

Pobieranie materiału

Surowica:

Używać świeżej surowicy odciągniętej po odwirowaniu z krwi pełnej pobranej na skrzep. Próbki mogą być przechowywane w temp. 2-8°C do 8 dni. W celu dłuższego przechowywania próbki należy zamrozić (-20°C).

Osocze:

Pobrać materiał do probówki z EDTA. Chcąc używać innych antykoagulantów, należy najpierw sprawdzić ich przydatność (prawidłowość otrzymywanych wyników). Odwirować, odciągnąć osocze. Test należy wykonać do 24 godzin od pobrania materiału.

Nie używać hemolizowanych i zanieczyszczonych próbek.

Wykonanie:

Kontrola jakości: Przed wykonaniem rutynowych badań wskazane jest sprawdzenie odczynnika lateksowego z każdą kontrolą z zestawu, postępując zgodnie z procedurą opisaną w części TEST JAKOŚCIOWY. Reakcja pomiędzy kontrolą dodatnią a odczynnikiem powinna dać wyraźną aglutynację różniącą się od jednorodnego wyglądu kontroli ujemnej. Jeżeli reakcja ta nie wystąpi, to zestawu nie należy używać.

Aby użyć odpowiedniej ilości odczynnika, kropliemierz należy trzymać pionowo i zakroplic tylko jedną kroplę.

TEST JAKOŚCIOWY

- Doprowadzić odczynniki do temperatury pokojowej (20-30°C).
- Delikatnie potrząsnąć buteleczką z odczynnikiem, aby dokładnie i równomiernie zawiesić w buforze cząsteczki lateksu.
- Nanieść 50 μ l materiału badanego (lub 1 kroplę kontroli) na pole testowe
- Wymieszać odczynnik w buteleczce i umieścić 1 kroplę obok próbki.
- Zmieszać patyczkiem obie krople tak, aby pokryć całe pole testowe
- Mieszać ręcznie ruchami kolistymi przez 2 minuty lub przy użyciu wytrząsarki z prędkością 80-100 rpm.
- Odczytać wynik aglutynacji.

monogen

Interpretacja wyników

Wynik dodatni:

Występuje aglutynacja. Próbka zawiera heterofilne przeciwciała przeciwko IM

- 3+ Duże zlepy na przejrzystym podłożu.
- 2+ Średnie zlepy wśród lekko mętnego płynu
- 1+ Małe zlepy wśród mętnego płynu

Wynik ujemny:

Brak aglutynacji, jednorodna zawiesina.

TEST PÓLIŁOŚCIOWY

- Nanieść 50 µl soli fizjologicznej na pola testowe od 1 do 6.
- Przy użyciu pipety automatycznej, nanieść 50 µl surowicy na pole 1.
- Używając tej samej pipety, w celu dokładnego wymieszania kilkakrotnie wciągnąć i wypuścić sól fizjologiczną i surowicę na polu 1.
- Pobrać 50 µl mieszaniny z pola 1 i przenieść na pole 2.
- Powtórzyć w/w czynność w celu dokładnego wymieszania składników aż do pola 6, z którego na koniec należy usunąć 50 µl.
- Zbadać każde rozcieńczenie zgodnie z metodyką opisaną w części TEST JAKOŚCIOWY

Interpretacja wyników

Mianem IM w próbce jest najwyższe rozcieńczenie, przy którym występuje jeszcze aglutynacja.

Ograniczenia metody

- Wyniki muszą być interpretowane z uwzględnieniem klinicznych, hematologicznych i serologicznych informacji o pacjencie.
- Czasem przeciwciała heterofilne w wykrywalnym stężeniu pojawiają się później niż objawy choroby. Jeżeli symptomy utrzymują się, to należy po kilku dniach powtórzyć badanie. U niektórych pacjentów, głównie u dzieci i młodzieży wyniki mogą pozostać przez cały czas negatywne. Odnotowano, że tylko 80-90% młodzieży i poniżej 50% małych dzieci wytwarza heterofilne przeciwciała
- Wyniki fałszywie dodatnie odnotowywano w próbkach od pacjentów zarażonych cytomegalowirusem, zółtaczką zakaźną typu A, parwowirową i leptospirozą.
- Przeciwciała heterofilne mogą w niektórych przypadkach utrzymywać się na poziomie wykrywalnym przez miesiące, a rzadziej nawet przez lata.
- Jakkolwiek miano przeciwciał heterofilnych ma niewielki związek z nasileniem choroby, metoda półilościowa może być używana przy monitorowaniu rozwoju infekcji.

Oczekiwane wartości

Z różnorodnych badań (11,12) nad obecnością przeciwciał przeciwko IM u dawców krwi, wynika, że z chorobą zetknięto się od 0,9 do 1,7% populacji. Ponieważ obecność przeciwciał przeciwko IM wskazuje na

w miarę świeżą infekcję, to te rezultaty sugerują, że zachorowań jest więcej niż zdiagnozowanych przypadków.

Ocena jakości

W celu określenia czułości i specyficzności testu wykonano badania porównujące **monogen** z różnymi powszechnie dostępnymi testami hemaglutynacji. Różnymi testami hemaglutynacyjnymi wybrano 106 próbek dodatnich i 114 ujemnych.

Niezgodności w wynikach otrzymanych różnymi testami zostały rozstrzygnięte przy użyciu specyficznych dla wirusa Epstein-Bera (EBV) badań serologicznych.

W badaniach tych oznaczono miano przeciwciał specyficznych do antygeny otoczki (Capsie antygen) EBV (zarówno IgG jak i IgM), EBV Early antygen (zarówno diffused-D-, jak i restricted -R-) oraz antygeny jądra EBV. Wyniki tych badań specyfikują, czy infekcja IM jest świeża lub ostra, kiedy to surowica powinna być dodatnia, lub czy jest to infekcja stara, gdy przeciwciała powinny być nieobecne lub obecne w ilościach szczątkowych, kiedy to surowica uważana jest za ujemną. Dwanaście ze 100 zgodnych surowic dodatnich i pięć ze 106 zgodnych surowic ujemnych przebadano również z zastosowaniem tych samych specyficznych badań serologicznych. We wszystkich przypadkach wyniki dodatnie i ujemne potwierdziły się w testach specyficznych dla EBV. W porównaniu z testami hemaglutynacyjnymi czułość testu **monogen** wynosi 94%, zaś jego specyficzność 93%. Przyjmując, że zgodność wyników z testami serologicznymi EBV wykonanymi na próbkach o niezgodnych wynikach w połączeniu z wynikami wszystkich testów, określono czułość testu **monogen** na 99% w odniesieniu do specyficznych testów EBV, zaś jego specyficzność na 93% (również w odniesieniu do testów specyficznych). Otrzymano tylko jeden wynik ujemny w teście **monogen** i dodatni w teście EBV. Próbka ta została określona jako pochodząca z ustępującej, a nie ostrej

infekcji, ze względu na brak anty VCA IgM i antygeny jądrowego. Z tego powodu wynik ujemny nie może być interpretowany jako efekt prozone.

W osobnym badaniu **monogen** porównano z jakościowym testem czerwonych krwinek końskich, z użyciem 224 próbek osocza pobranego na EDTA. Uzyskano całkowitą zgodność wyników, wśród których 51 było dodatnie a 173 ujemne. Podsumowując, wyniki badań wskazują jasno, że **monogen** jest testem o wysokiej specyficzności i czułości przy diagnozowaniu IM.

Panel 10 dodatnich próbek surowicy przebadano przez 3 kolejne dni metodą półilościową. Wyniki testu wskazują, że **monogen** posiada 100% precyzję. Błąd w powtórzeniach wydaje się być spowodowany tylko nieprawidłowościami w rozcieńczeniach.

Bibliografia

1. Davidsohn I, Stern K and Kashiwagi C. The Differential Test for Infectious Mononucleosis. Amer J Clin Pathol 21: 1101-1113, 1951.
2. Paul JR and Bunnell WW. The Presence of Heterophile Antibodies in Infectious Mononucleosis. Amer J Med Sci 183: 90-104, 1932.
3. Beer P. The Heterophile Antibodies in Infectious Mononucleosis and after the Injection of Serum. J Clin Invest 15: 591-599, 1936
4. Bailey GH and Raffel S Hemolytic Antibodies for Sheep and Ox Erythrocytes in Infectious Mononucleosis. J Clin Invest 14: 228-244, 1935
5. Forssman J Die Herstellung Hochwertiger Spezifischer Schafhamolysine ohne Verwendung von Schafblut. Biochem Ztschr. 37: 78-115, 1911
6. Davidsohn I. Serologic Diagnosis of Infectious Mononucleosis. JAMA 108: 289-295, 1937.
7. Stuart CA, Buegess AM, Lawson HA and Wellman HE. Some cytologic and Serologic Aspects of Infectious Mononucleosis. Arch Intern Med 54: 199-214; 1934
8. Henle G, Henle W and Diehl V. Relation of Burkitt's Tumor-Associated Herpes-Type Virus to Infectious Mononucleosis. Proc Nat Acad Sci USA 59: 94-101, 1968.
9. Hoagland RJ. The Transmission of Infectious Mononucleosis. Amer J Med Sci 229: 262-272, 1955
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC/NIH manual, 4th Edition, 1999.
11. Barret AM. The Serological Diagnosis of Glandular Fever (Infectious Mononucleosis); a New Technique. J Hyg 41: 330, 1941
12. Virtanen, S. Incidence of Infectious Mononucleosis Antibodies in Blood Donors. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand 56: 53-56, 1962

BIOKIT, S.A. - 08186 Lliçà d'Amunt - Barcelona – SPAIN



3800-1227
09/2007

DYSTRYBUTOR:

ALPHA DIAGNOSTICS sp. z o.o.,
01-347 Warszawa, ul. Gabriela 2 Dział sprzedaży - tel. 6327513; centrala - 6314013; fax 6324211;
Produkcja, Magazyn, Kontrola Jakości, Serwis: ul. Stępińska 22/30 00-739 Warszawa tel. 6314227; fax 6314823
e-mail: ad@alphadiag.com.pl;
www.alphadiag.com.pl

Sporządzono dnia 18.02.2004
Aktualizacja 2 01.04.2008