

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca BOHAR

**PRIMERJAVA ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA
S KEMILUMINISCENČNIM TESTOM ZA
DIAGNOSTIKO INFEKCIJ
Z VIRUSOM EPSTEIN-BARR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca BOHAR

**PRIMERJAVA ENCIMSKO IMUNKEGA TESTA
S KEMILUMINISCENČNIM TESTOM ZA DIAGNOSTIKO
INFEKCIJ Z VIRUSOM EPSTEIN-BARR**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF ENZYME IMMUNO ASSAY
TO CHEMILUMINESCENCE ASSAY
IN EPSTEIN-BARR VIRUS DIAGNOSIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Jožico Marin in za recenzentko doc. dr. Eva Ružić-Sabljić.

Mentorica: prof. dr. Jožica Marin
Recenzentka: doc. dr. Eva Ružić-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Jožica Marin
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Eva Ružić-Sabljić
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 07. 04. 2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Bohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 578.7:616-006-078(043)=863

KG Epstein-Barr virus/herpesvirus/infekcijska mononukleoza/Burkittov limfom/rak nosno-žrelnega
prostora/encimsko imunski test/kemiluminiscenčni test

AV BOHAR, Mojca

SA MARIN, Jožica (mentorica)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije

LI 2006

IN PRIMERJAVA ENCIMSKO IMUNSKEGA TESTA S
KEMILUMINISCENČNIM TESTOM ZA DIAGNOSTIKO INFEKCIJ Z
VIRUSOM EPSTEIN-BARR

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XIV, 71 str., 14 pregl., 17 sl., 1 pril., 58 vir

IJ sl

JI sl/en

AI Virus Epstein-Barr ali človeški herpesvirus 4 je povzročitelj številnih bolezni, kot so infekcijska mononukleoza, karcinom nosno-žrelnega prostora, Burkittov limfom in druge limfoproliferativne motnje pri imunsko oslabljenih osebah. Organizem gostitelja odgovori na okužbo z virusom Epstein-Barr s tvorbo različnih protiteles. Najprej se pojavijo protitelesa proti zgodnjemu antigenu in protitelesa proti virusnemu kapsidnemu antigenu, kasneje pa še protitelesa proti jedrnemu antigenu. Namen naloge je bil, ugotoviti serološki odziv pri bolnikih, okuženih z virusom Epstein-Barr, z encimsko imunskim testom–aparatura ETI STAR TM in primerjati rezultate s še ne preizkušenim kemiluminiscenčnim testom–aparatura LIAISON. Testa sta si v osnovi zelo podobna. V raziskavo smo vključili 100 vzorcev (99 serumov in 1 likvor) in dokazali, da je diagnostična občutljivost zelo visoka za vsa testirana protitelesa, kar kaže, da je kemiluminiscenčni test zelo dober za zaznavanje okužbe z virusom Epstein-Barr in ga zaradi njegovih lastnosti lahko uporabimo v diagnostične namene.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 578.7:616-006-078(043)=863
CX Epstein-Barr virus/herpesvirus/infectious mononucleosis/Burkitt's lymphoma/nasopharyngeal carcinoma/enzyme-linked immunosorbent assay/chemiluminescence immunoassay
AU BOHAR, Mojca
AA MARIN, Jožica (supervisor)/RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI COMPARISON OF ENZYME IMMUNO ASSAY TO CHEMILUMINESCENCE ASSAY IN EPSTEIN-BARR VIRUS DIAGNOSIS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 71 p., 14 tab., 17 fig., 1 ann., 58 fer.
LA sl
AL sl/en

AB Numerous diseases are caused by the Epstein-Barr virus, also known as human herpesvirus 4. These diseases are infectious mononucleosis, nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma and other lymphoproliferative disorders in patients with weak immune system. Once infected with Epstein-Barr virus, the host organism responds in order to create several antibodies. First, the antibodies against Early Antigen and the antibodies against Virus Capside Antigen are created, later the antibodies against Epstein-Barr Nuclear Antigen are following. The purpose of graduate thesis was to determine the serological response in Epstein-Barr virus infected patients with an Enzyme Linked Immunosorbent Assay, using the ETI STAR TM device and Chemiluminescence Immunoassay, using the LIAISON device. The results of Enzyme Linked Immunosorbent Assay were then compared with results of a not-yet-tested Chemiluminescence Immunoassay. Basically, both assays are very similar to each other. During the research, 100 samples were analysed (99 serums and 1 cerebrospinal fluid). The research proved successfully that, in all analysed antibodies the diagnostic sensitivity was very high. This means that, the chemiluminescence assay is very suitable for a detection of Epstein-Barr virus infection and for that, we can use it for the clinical diagnosis.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINSKI PREGLED	3
2.3 ZNAČILNOSTI VIRUSA EPSTEIN-BARR	4
2.3.1 Taksonomska uvrstitev VEB	4
2.3.2 Zgradba VEB	6
2.4 GENOM VEB IN VIRUSNI PROTEINI	8
2.4.1 Virusni genom	8
2.4.2 Virusni proteini	10
2.4.2.1 Proteini latentne stopnje	10
EB jedrni proteini	11
Latentni membranski proteini	12
2.4.2.2 Proteini litične stopnje	13
Takojšnji-zgodnji geni	13
Zgodnji geni	13
Pozni geni	14
2.4.2.3 Proteini, homologni človeškim beljakovinam	14
2.5 OKUŽBE CELIC Z VEB	15

2.5.1	Okužba epitelijskih celic	15
2.5.2	Okužba limfocitov	15
2.6	RAZMNOŽEVANJE VEB	17
2.7	IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO	19
2.7.1	Humoralni imunski odziv	19
2.7.2	Celični imunski odziv	21
2.8	BOLEZNI, POVEZANE Z VEB	22
2.8.1	Infekcijska mononukleoza	22
2.8.1.1	Akutna infekcijska mononukleoza	22
2.8.2.1	Kronična infekcijska mononukleoza	24
2.8.2	Burkittov limfom	24
2.8.3	Karcinom nosno-žrelnega prostora	26
2.8.4	Hodgkinova bolezen	27
2.8.5	Okužbe z VEB pri imunsko pomanjkljivih osebah	28
2.8.5.1	T-celični limfomi	28
2.8.5.2	B-celični limfomi	29
	Na X kromosom vezan limfoproliferativni sindrom	29
	Limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov in kostnega mozga	29
	Limfomi pri bolnikih z AIDS-om	30
	Ustna lasasta levkoplakija	30
2.9	EPIDEMIOLOGIJA	32
2.9.1	Način prenosa virusa	33
2.9.2	Razširjenost VEB v Sloveniji	33
2.10	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z VEB	34
2.10.1	Zdravljenje	34
2.10.2	Preprečevanje	35
2.20.2.1	Cepiva proti VEB	35
2.11	LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VEB	37
2.11.1	Neposredne metode dokazovanja VEB	37
2.11.2	Posredne metode dokazovanja VEB	37

3	MATERIAL IN METODE	40
3.1	MATERIAL	40
3.1.1	Zbiranje in shranjevanje kliničnih vzorcev	40
3.1.2	Oprema, testni kompleti in reagenti za encimsko imunsko metodo	40
3.1.3	Oprema in reagenti za kemiluminiscenčno metodo	44
3.1.3.1	Kalibracija aparature	46
3.2	METODI	46
3.2.1	Encimsko imunski test	46
3.2.1.1	Postopek testa	46
3.2.1.2	Način podajanja rezultatov	47
3.2.2	Kemiluminiscenčni test	48
3.2.2.1	Princip testa	48
3.2.2.2	Postopek testa	50
3.2.2.3	Način podajanja rezultatov	51
3.2.2.4	Vrednotenje rezultatov metod ELISA in CLIA	52
3.3	VREDNOTENJE METOD	53
3.3.1	Diagnostična občutljivost	53
4	REZULTATI	54
4.1	PRIMERJAVA REZULTATOV METOD ELISA IN CLIA	54
4.2	ANALIZA VZORCEV, KATERIH REZULTATI SE NISO UJEMALI	55
4.3	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	RAZPRAVA	60
5.2	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI	65
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Razporeditev človeških herpesvirusov (družina <i>Herpesviridae</i>)	5
Pregl. 2: Proteini VEB, ki se izrazijo v latentno okuženih celicah	11
Pregl. 3: Diagnostični postopki za dokazovanje okužb z VEB	39
Pregl. 4: Kalibratorji za izvedbo testa ELISA	42
Pregl. 5: Konjugati in razredčevalna sredstva za sekundarna protitelesa	43
Pregl. 6: Mejne vrednosti encimsko imunskega testa	48
Pregl. 7: Mejne vrednosti kemiluminiscenčnega testa	51
Pregl. 8: Rezultati pri različnih stopnjah okužbe	52
Pregl. 9: Število rezultatov (opredeljenih stopenj okužb) metod ELISA in CLIA	54
Pregl. 10: Prikaz 9 vzorcev, ki se niso ujemali v stopnji okužbe in v koncentraciji protiteles	57
Pregl. 11: Rezultati metode ELISA (delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov)	58
Pregl. 12: Rezultati metode CLIA (delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov)	58
Pregl. 13: Diagnostična občutljivost pri metodi ELISA	59
Pregl. 14: Diagnostična občutljivost pri metodi CLIA	59

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1 in 2: VEB v okuženi celici pod elektronskim mikroskopom	6
Sl. 3: Zgradba VEB	7
Sl. 4a in 4b: Genom VEB in odprti bralni okvirji restrikcijske mape <i>Bam</i> HI	8
Sl. 5: Okužbe celic z VEB	16
Sl. 6: Prikaz transkripcije, translacije in replikacije DNK herpesvirusa	18
Sl. 7: Značilna serološka reakcija bolnika na okužbo z VEB	19
Sl. 8: Vnetje žrela pri IM	23
Sl. 9: Burkittov limfom pri dečku	25
Sl. 10: Povečane in otrdele limfne žleze na vratu bolnika s KNŽ	27
Sl. 11: Benigne lezije na jeziku, posledica ustne lasaste levkoplakije	31
Sl. 12: Aparatura ETI-STAR TM proizvajalca Dia Sorin	41
Sl. 13: Aparatura LIAISON proizvajalca Dia Sorin	44
Sl. 14: Komercialni reagentni integrali in reakcijske posodice	45
Sl. 15: Princip kemiluminiscenčnega testa CLIA	49
Sl. 16: Kemiluminiscenčna reakcija	50
Sl. 17: Grafičen prikaz primerjave rezultatov metod ELISA in CLIA	55

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: NAVODILA ZA UPORABO APARATURE LIAISON

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<u>okrajšava</u>	<u>pomen</u>
2 A	akutna okužba
3 ACIF	antikomplementna imunofluorescenca (angl.: anticomplement immunofluorescence assay)
AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (angl.: acquired immunodeficiency syndrome)
AILD	angoimunoblastna limfadenopatija (angl.: angioimmunoblastic lymphadenopathy)
Ap	akutna pozna okužba
AU	arbitrarna enota (angl.: arbitrary unit)
Az	akutna zgodnja okužba
BL	Burkittov limfom (angl.: Burkitt's lymphoma)
BSA	goveji serumski albumin (angl.: bovine serum albumin)
CLIA	kemiluminiscenčni test (angl.: chemiluminescence immunoassay)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
4 EA	zgodnji antigen (angl.: early antigen)
EBER	RNK, ki jo kodira Epstein-Barr (angl.: Epstein-Barr encoded RNA)
EBNA	Epstein-Barr jedrni antigen (angl.: Epstein-Barr nuclear antigen)
ELISA	encimsko-imunski test (angl.: enzyme linked immunosorbent assay)
HB	Hodgkinova bolezen
HHV	človeški herpes virus (angl.: human herpes virus)
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (angl.: human immunodeficiency virus)
HRP	encim hrenova peroksidaza
gp	glikoprotein
IL	interlevkin
IIF	posredna imunofluorescenca (angl.: indirect immunofluorescence assay)
IM	infekcijska mononukleoza (angl.: infectious mononucleosis)
IR	notranje ponovitve (angl.: internal repeats)
K	konvalescenca

kbp	kilo bazni par
kDa	kilo Dalton
KNŽ	karcinom nosno-žrelnega prostora (angl.: NPC–nasopharyngeal carcinoma)
kr.ok.	kronična okužba
LMP	latentni membranski protein
MA	matriksni protein
N	nedavna okužba
nm	nanometer
No	ni okužbe
OHL	ustna lasasta levkoplakija (angl.: oral hairy leukoplakia)
P	pretekla okužba
PBS	fosfatni pufer (angl.: phosphate buffer solution)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
PTLD	limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov in kostnega mozga (angl.: post transplant lymphoproliferative disease)
R	reaktivacija
RLU	relativne luminiscenčne enote (angl.: relative luminescence units)
RNK	ribonukleinska kislina
RP	resnično pozitiven rezultat
S	sekundarna EBNA-negativnost
Se	občutljivost (angl.: sensitivity)
TR	končne ponovitve (angl.: terminal repeats)
VAHS	hemofagocitni sindrom (angl.: virus associated hemophagocytic syndrome)
VCA	virusni kapsidni antigen (angl.: viral capsid antigen)
VEB	virus Epstein-Barr
X-LPS	na X kromosom vezan limfoproliferativni sindrom (angl.: X-linked lymphoproliferative syndrome)

SLOVARČEK

ELISA je encimsko imunski test, s katerim določamo protitelesa proti virusnim antigenom tako, da imamo rekombinantne virusne antigene vezane na trdni nosilec in po vezavi antigen-protitelo nastali kompleks dokažemo s sekundarnimi protitelesi, na katera je konjugiran encim. Če pride do vezave sekundarnih protiteles na prvi kompleks, se encim aktivira in njegovo aktivnost dokažemo z dodatkom substrata zanj, kar je povezano z barvno reakcijo, ki jo merimo spektrofotometrično.

CLIA je kemiluminiscenčni test, ki je v osnovi podoben encimsko imunskemu testu, le da tu uporabimo kot trdno fazo magnetne kroglice na katere je vezan sintetični polipeptid; polipeptid je analog nativnim virusnim antigenom. Protitelesa, ki jih določamo, se vežejo na antigen; vezavo dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, na katera je konjugiran izoluminolni derivat. Če pride do vezave izoluminolnega-protitelesnega konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju posebnega reagenta sprosti svetlobni signal, ki ga aparatura zmeri kot relativne svetlobne enote.

AKUTNA OKUŽBA (Az = akutna zgodnja, A = akutna in Ap = akutna pozna okužba) je okužba z izraženimi kliničnimi znaki bolezni. Pride do močnega porasta protiteles IgM proti VCA (IgM anti-VCA), ki pa jih v nekaj tednih nadomestijo protitelesa IgG proti istemu antigenu (IgG anti-VCA). Ta se ohranijo doživeljsko. Pojav protiteles IgG proti zgodnjemu antigenu EA (IgG anti-EA) je ponavadi zakasnel (vztrajajo nekaj tednov), v tem obdobju ni protiteles proti EBNA (anti-EBNA1).

Med **KONVALESCENCO** (K) oz. prebolevanjem bolezni koncentracije protiteles IgM anti-VCA in IgG anti-EA padejo nizko ali jih celo ne moremo določiti, navzoča so protitelesa IgG anti-VCA. Ponavadi med konvalescenca še ne določamo IgG anti-EBNA1.

Pri **NEDAVNI OKUŽBI** (N) bolezenski znaki navadno izginejo, serološko pa lahko ugotovimo, da od začetka okužbe ni minilo več kot 3 do 6 tednov. Navzoča so samo protitelesa IgG anti-VCA in včasih tudi IgG anti-EA.

PRETEKLA OKUŽBA (P) pomeni stik z virusom v preteklosti in ta oseba nima izraženih kliničnih znakov (od okužbe je minilo več kot 6 tednov). Za to obdobje so značilna protitelesa anti-EBNA1 in visoka koncentracija protiteles IgG anti-VCA. Protiteles IgM anti-VCA ter IgG anti-EA ni več.

SEKUNDARNA anti-EBNA negativnost (S) je značilna pri imunsko oslabljenih bolnikih (supresija celične imunosti, zdravljenje z imunosupresivnimi zdravili, okužba s HIV in drugo), kjer titri IgG anti-VCA in IgG anti-EA porastejo nespecifično, protitelesa proti EBNA pa lahko izginejo. Sekundarno anti-EBNA1 negativnost lahko napačno interpretiramo kot primarno okužbo. Z določanjem avidnosti protiteles IgG anti-VCA in IgG anti-EA lahko ločimo med primarno in sekundarno anti-EBNA1 negativnostjo.

REAKTIVACIJA virusa (R) poteka z ali brez bolezenskih znakov in to navadno pri imunsko pomanjkljivih osebah. Za njo so značilni visoki titri protiteles proti litičnim antigenom (IgG anti-VCA in IgG anti-EA); virusi se iz limfocitov B sproščajo in napadajo nove limfocite B.

1 UVOD

Virus Epstein-Barr (VEB; ime dobil po dveh angleških znanstvenikih Epstein-u in Barr-u, ki sta ga odkrila) ali človeški herpesvirus 4 (HHV-4), spada v družino herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružino gamaherpesvirusov (*Gamamaherpesvirinae*) in v rod limfokriptovirus (*Lymphocryptovirus*). Razširjen je povsod po svetu in z njim pridemo v stik pogosto že zgodaj v otroštvu. Z njim je v razvitih državah okužene 80-90 % odrasle populacije, v državah v razvoju pa naj bi do okužb z virusom prišlo že pri otrocih do drugega leta starosti. Virus se najpogosteje prenaša s slino (znana je bolezen poljubljanja; angl.: kissing disease), nedavno pa je bil odkrit tudi v mleku 46 % doječih mater, kar predstavlja do sedaj manj znano pot širjenja.

Po prvi okužbi se lahko pojavijo klinični znaki, vendar v večini primerov poteka okužba brez njih. Virusi lahko mirujejo, občasno pa se ponovno aktivirajo. Reaktivacije so pogoste pri imunsko oslabljenih osebah (majhni otroci, bolniki po presaditvi organov, bolniki z AIDS-om in drugi). Pri teh osebah pride do nenadzorovanega razmnoževanja z VEB transformiranih limfocitov B. Pomemben vpliv na izid okužbe imata tako virus kot gostitelj, na razvoj nekaterih bolezni pa tudi okolje.

VEB je povzročitelj številnih bolezni, kot so infekcijska mononukleoza (IM), karcinom nosno-žrelnega prostora (KNŽ), Burkittov limfom (BL) in druge limfoproliferativne motnje pri imunsko oslabljenih osebah. Povezujejo ga tudi z limfoproliferativno boleznijo po presaditvi organov, s Hodgkinovo boleznijo (HB), ne-Hodgkinovo boleznijo pri bolnikih z AIDS-om in gladko-mišičnimi tumorji pri otrocih z imunsko pomanjkljivostjo.

Primarna okužba z VEB se začne z vstopom v epiteljske celice nosno-žrelnega prostora, kjer poteka razmnoževanje virusa in sproščanje. Naslednje celice, ki jih virus okuži, so limfociti B, kjer je virus prisoten doživljenjsko, hkrati pa se iz njih razširi še v druga tkiva. Zaradi onkogenega potenciala transformira limfocite B, kar ob imunski oslabelosti povzroči nastanek limfomov. Virus po primarni okužbi vstopi v latentno fazo. Klinično so primarne okužbe mile, omejene na otroštvo, pri mladostnikih in odraslih pa se kažejo najpogosteje kot infekcijska mononukleoza (35–75 % vseh okužb).

Organizem gostitelja odgovori na okužbo z VEB s tvorbo različnih protiteles, specifičnih za različne vrste virusnih antigenov. Imunski odgovor na okužbo z VEB je zelo širok. Po primarni okužbi se najprej pojavijo protitelesa proti zgodnjemu antigenu (EA; angl.: early antigen) in virusnemu kapsidnemu antigenu (VCA; angl.: virus capsid antigen), nekaj tednov po okužbi pa še protitelesa proti jedrnemu antigenu (EBNA; angl.: Epstein-Barr nuclear antigen), ki tudi uravnavajo latenco VEB. Med reaktivacijo virusa so navzoča protitelesa proti EA in VCA, v latentnem stanju protitelesa proti EA izginejo. Protitelesa proti VCA in EBNA se ohranijo skozi vse življenje.

Za ugotavljanje okužbe z VEB je pomembno, da je diagnostični postopek hiter in specifičen. Danes za klinično uporabo prevladuje encimsko imunski test ELISA (angl.: enzyme immunosorbent assay), s katerim dokazujemo protitelesa proti nativnim in rekombinatnim antigenom, vezanim na trden nosilec. Včasih uporabimo tudi molekularno biološke metode, s katerimi dokazujemo genom VEB v okuženih celicah bolnika. Poskus izolacije virusa iz kužnine je zahteven postopek in ga v diagnostiki ne uporabljamo.

Če je rezultat seroloških preiskav nejasen, uporabimo še test avidnosti. Uporaben je predvsem, ko je funkcionalna imunost velikega pomena, npr. pri testiranju pred in med nosečnostjo ter pri določanju imunskega statusa osebe. Test avidnosti uporabimo tudi za razlikovanje pasivno pridobljenih materinih protiteles IgG visoke avidnosti oz. nizko avidnih protiteles IgG, ki jih otrokov imunski sistem ustvari po okužbi.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naše naloge je bil, da ugotovimo serološki odziv bolnikov, okuženih z VEB, s testom ELISA in s kemiluminiscenčnim testom CLIA (angl.: chemiluminescence immunoassay), primerjamo rezultate obeh metod med seboj, ugotovimo specifičnost in ovrednotimo, katera metoda ima večjo diagnostično vrednost.

5 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Prvič je omenil VEB Denis Burkitt leta 1964 in ga označil za povzročitelja geografsko omejenega tumorja, ki se je pojavil pri otrocih v Ugandi v centralni Afriki (Burkitt, 1958). Tumor so poimenovali po njem Burkittov limfom (BL). Nekoliko kasneje leta 1964 so tumorski material BL nasadili na celične kulture (Epstein in Barr, 1964) in z elektronskim mikroskopom videli virusne delčke, podobne virusu herpesa simpleksa, le da so bili ti manjši (Epstein in Barr, 1964); to je bilo odkritje virusa Epstein-Barr. Leta 1966 so s posredno imunofluorescenčno metodo (IIF) dokazali pri bolnikih z BL iz Afrike in tudi pri posameznikih iz Amerike protitelesa proti VEB (Handle G. in Handle W., 1966). Istega leta so pri seroepidemioloških raziskavah pokazali tudi, da je bil moški, ki je bil zaposlen pri teh raziskavah, seropozitiven, potem ko je prebolel IM (Hanle G. in Hanle W., 1966). Leta 1979 so dokazali, da so protitelesa proti VEB vedno prisotna po IM, kar je potrdilo, da je VEB edini etiološki povzročitelj IM (Niederman in sod., 1970; de Thé G, 1978). Kasnejše študije so pokazale tudi, da obstaja povezava med infekcijo z VEB in KNŽ (Old in sod., 1966; Wolf in sod., 1973) in ugotovili, da je ta karcinom pogostejši v južnem delu Kitajske. Od odkritja leta 1964 virus povezujejo s številnimi drugimi limfnimi in epiteljskimi tumorji, kot so: limfoproliferativne lezije in limfomi, ki se razvijejo pri imunsko pomanjkljivih posameznikih, določeni tipi T celičnih limfomov (Jones in sod., 1988), Hodgkinov limfom (Anagnostopoulos in sod., 1989; Weiss, 1987; Weiss, 1989) in večina karcinomov črevesa (Tokunaga in sod., 1993). Virus so odkrili tudi v benignih epiteljskih lezijah ustne lasaste levkoplakije (OHL; angl.: oral hairy leukoplakia), pri tumorjih gladkih mišic (Lee, 1995) in v mleku doječih mater (Junker, 1991).

V Sloveniji je bila narejena raziskava, kjer so določali prekuženost odrasle zdrave populacije z VEB in ugotovili, da približno polovico bolnikov s sumom na primarno okužbo z VEB spremlja sindrom IM, pri drugi polovici pa poteka okužba brez ali z enim prevladujočim bolezenskim znamenjem (okvara delovanja jeter na prvem mestu) (Marin, 1990).

5.3 ZNAČILNOSTI VIRUSA EPSTEIN-BARR

5.3.1 Taksonomska uvrstitev VEB

Virus Epstein-Barr (VEB) ima deoksiribonukleinsko kislino (DNK). Spada v družino herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružino gamaherpesvirusov (*Gamamaherpesvirinae*) in v rod limfokriptovirus (*Lymphocryptovirus*). Je eden izmed osmih znanih človeških herpesvirusov (Levy, 1999; Brooks in sod., 2001; Koren in sod., 2002), katerih delitev poteka na osnovi bioloških značilnosti. Njegovo uradno poimenovanje je človeški herpesvirus 4 (HHV-4). Poznamo še preko 100 drugih herpesvirusov, ki okužijo številne živalske vrste (različne vrste opic, prašiče, govedo, konje in druge).

Predstavniki poddružine Alfaherpesvirusov so ponavadi hitro rastoči, citolitični virusi, ki vzpostavijo latentno stanje v nevronih. Predstavniki so: človeški herpesvirus 1 oz. virus herpes simpleks 1 (rod *Simplexvirus*), ki povzroča suho grlo, vročino ter očesne in možganske infekcije; človeški herpesvirus 2 oz. herpes simpleks virus 2 (rod *Simplexvirus*), ki povzroča genitalni herpes; v to poddružino spada tudi človeški herpesvirus 3 oz. virus varičela-zoster (rod *Varicellavirus*), ki povzroča norice; ob reaktivaciji povzroči bolečo kožno bolezen-pasasti izpuščaj ali pasavec (zoster).

Betaherpesvirusi so počasi rastoči herpesvirusi, ob okužbi so značilne celice velikanke, latentno stanje pa vzpostavijo v limfocitih, žlezah slinavkah in ledvicah. Predstavniki so: človeški herpesvirus 5 oz. citomegalovirus (rod *Cytomegalovirus*), ki povzroča okvare ploda, infekcijsko mononukleozo pri mladih odraslih osebah in hude okvare organov pri imunsko pomanjkljivih bolnikih; človeški herpesvirus 6 (rod *Roselovirus*), ki povzroča v otroštvu kožni izpuščaj z vročino in bolezen, podobno mononukleози pri odraslih. V to poddružino spada še človeški herpesvirus 7 (rod *Roselovirus*). Človeška herpesvirusa 6 in 7 prištevamo glede na biološke značilnosti med betaherpesviruse, ker molekularne analize genoma kažejo večjo sorodnost z betaherpesvirusi; glede njihovega delovanja pa spadajo bolj med gamaherpesviruse, ker okužijo limfocite T in sta torej limfotropna.

Gamaherpesvirusi so latentni v limfocitih B, so limfoproliferativni in imajo različno dolge replikacijske cikle. Poleg VEB spada sem tudi človeški herpesvirus 8 oz. virus Kaposijevega sarkoma.

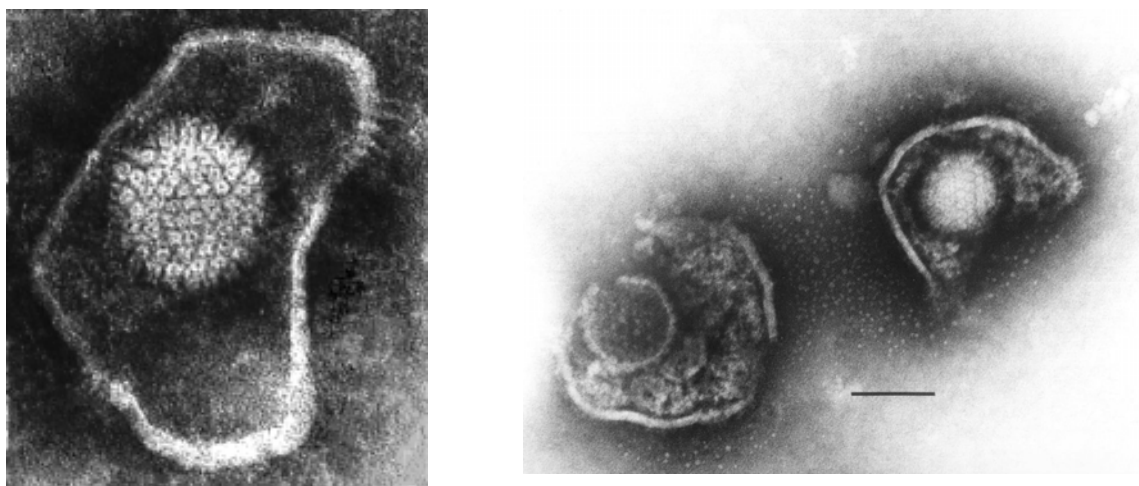
Razvrstitev človeških herpesvirusov prikazuje preglednica 1 (Levy, 1999; Brooks in sod., 2001; Koren in sod., 2002).

Preglednica 1: Razporeditev človeških herpesvirusov (družina *Herpesviridae*)

Poddružina	Rod	Uradno poimenovanje in oznaka	Pogosto poimenovanje	Biološke značilnosti (rast, citopatologija, mesto latentne okužbe)
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	človeški herpesvirus 1 – HHV-1	virus herpes simplex 1	hitro rastoči, citolitični, latentni v nevronih
		človeški herpesvirus 2 – HHV-2	virus herpes simplex 2	
	<i>Varicellovirus</i>	človeški herpesvirus 3 – HHV-3	virus varicella-zoster	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	človeški herpesvirus 5 – HHV-5	citomegalovirus	počasi rastoči, povzroča celice velikanke, latentni v žlezah slinavkah, ledvicah
	<i>Roseolovirus</i>	človeški herpesvirus 6 – HHV-6	človeški herpesvirus 6	počasi rastoči, limfoproliferajoči, latentni v limfocitih
		človeški herpesvirus 7 – HHV-7	človeški herpesvirus 7	
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	človeški herpesvirus 4 – HHV-4	virus Epstein-Barr	variabilna hitrost rasti, limfoproliferajoči, latentni v limfocitih
		človeški herpesvirus 8 – HHV-8	virus Kaposijevega sarkoma	

5.3.2 Zgradba VEB

Človeški herpesvirusi so si po zgradbi zelo podobni, zato VEB težko ločimo z elektronskim mikroskopom od drugih človeških herpesvirusov (slika 1 in 2).



Sliki 1 in 2: VEB v okuženi celici pod elektronskim mikroskopom (črta predstavlja dolžino 100 nm) (Stannard, Ackermann, 1995)

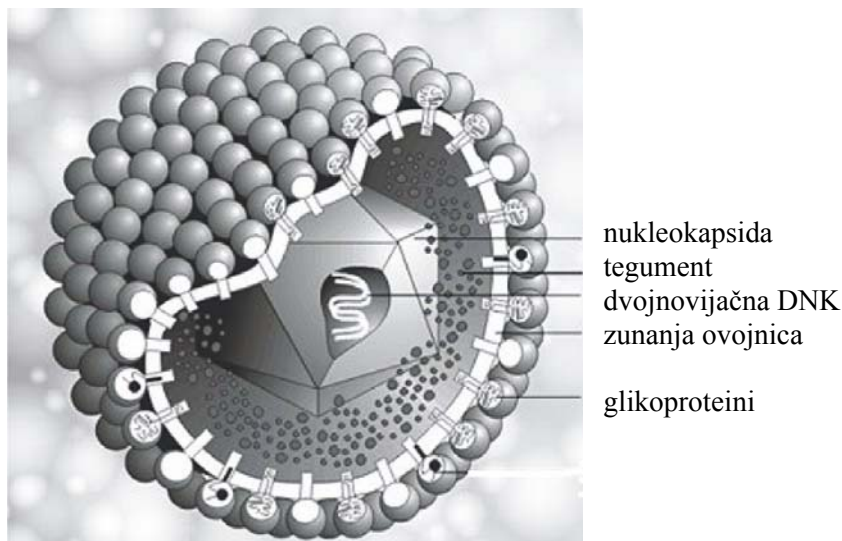
VEB je 150-200 nm velik virus z gostoto na gradientu cezijevega klorida 1,2-1,3 in molekulsko maso $114 \cdot 10^6$ Da.

Sestavljen je iz štirih morfoloških enot (slika 3):

- sredice
- kapside
- tegumenta in
- zunanje ovojnice.

Sredica VEB vsebuje linearno molekulo dvojnovijačne DNK, velikosti 184 kbp. Obdaja jo kapsida, ki je ikozaedrične oblike in vsebuje 162 kapsomer, v premeru meri 100 nm, vsaka kapsomera pa je sestavljena iz različnih proteinov. Amorfnoplast med nukleokapsido in zunanjo ovojnico je tegument, ki je fibrilne strukture in tipična le za herpesviruse. Zunanja

ovojnica je nepravilne oblike, izhaja iz jedrne membrane gostiteljske celice, meri v premeru 150-200 nm in je nujno potrebna za infektivnost virusa. V njo so vstavljeni iz zunanje strani virusno kodirani glikoproteini, ki predstavljajo poglavitne virusne antigene in matriksni proteini MA (angl.: matrix antigen), ki se nahajajo v notranjem sloju ovojnice in niso glikozilirani (Crawford, 2004).

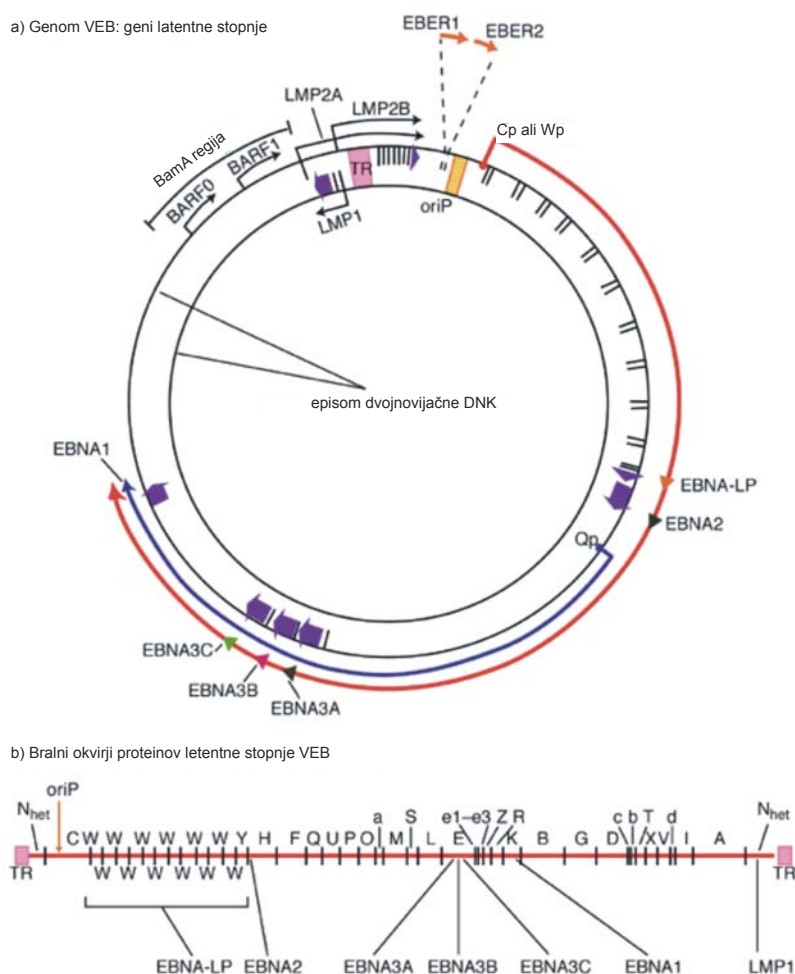


Slika 3: Zgradba VEB (Reschke, 1997)

2.4 GENOM VEB IN VIRUSNI PROTEINI

2.4.1 Virusni genom

Genom VEB (slika 4a) v zrelem virionu predstavlja linearna dvojnovijačna DNK dolžine 184 kbp. Vsebnost deleža G+C je 59 %. Strukturno genom vsebuje izmenične značilne odseke (U), notranje ponovitve IR (angl.: internal repeat) in končne ponovitve TR (angl.: terminal repeat), (Okano,1988). Glede na dve stanji genoma – aktivno in latentno, sta znani tudi dve mesti replikacije. Prvo je oriP, ki je v latentnem ciklu v delu genoma *Bam*HI (odprti bralni okvir latentnih proteinov VEB v največji restrikcijski mapi genoma prikazuje slika 4b), (Murray, 2001), drugo pa je oriLyt, kjer se začne replikacija med litičnim ciklom.



Slika 4a in b: Genom VEB in odprti bralni okvirji restrikcijske mape *Bam*HI (Murray, 2001)

Človeka lahko okužita dva tipa VEB: VEB tip 1 in VEB tip 2 (alternativno A in B), ki se razlikujeta v domenah, te pa kodirajo virusne latentne proteine. Čeprav tipa A in B ne kažeta specifične geografske razporeditve, je tip A pogostejši v Evropi in ZDA. Noben tip posebej ne kaže kakršnekoli povezave s specifično boleznijo. Razlike med tipoma se pojavljajo v številnih ponovitvenih zaporedjih v posameznih notranjih ponovitvah, kar določa specifični izolat glede na njegovo velikost latentnih genov in/ali njihovih produktov. Analize teh genov se uporabljajo v epidemioloških študijah za spremljanje virusnega prenašanja med družinami in v populaciji (Crawford, 2004).

2.4.2 Virusni proteini

Genom VEB kodira okrog 70 različno velikih proteinov, od katerih vsi še niso identificirani. V latentno okuženih celicah (limfocitih B) se poleg treh klasičnih skupin proteinov (proteini alfa, beta in gama), ki so značilni za litično infekcijo, izrazi še devet latentnih proteinov (šest EB jedrnih proteinov: EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C in LP; angl.: Epstein-Barr nuclear antigen) in trije latentni membranski proteini LMP (LMP1, 2A in 2B; angl.: latent membrane antigen); (preglednica 2), z litično okužbo pa so povezani takojšnji-zgodnji proteini ali alfa proteini, zgodnji proteini ali beta proteini in pozni ali gama proteini. Genom nosi zapis tudi za dve mali RNK (EBERs), ki se ne prevedeta in katerih funkciji še nista popolnoma znani (Crawford, 2004).

2.4.2.1 Proteini latentne stopnje

V času latentne stopnje se genom VEB ne vgradi v celično DNK, ampak se linearna oblika genoma zaokroži v episom, s kovalentnimi spojitvami terminalno ponavljajočih elementov, ki se avtonomno podvaja. Večina proteinov se sicer izrazi med aktivno stopnjo virusnega razmnoževalnega cikla, ampak devet proteinov pa le v latentno inficiranih celicah (neaktivni fazi razmnoževanja ali mirujoči fazi). Kmalu po okužbi se episom podvoji do večjega števila kopij vendar ločeno z celično DNK, nakar virusi ostanejo v jedru ter se porazdelijo z enakim deležem na hčerinske celice, kar omogoči, da število kopij na klon ostane stalno.

Preglednica 2: Proteini VEB, ki se izražajo v latentno okuženih celicah (Crawford , 2004)

Antigenski kompleks	Molekulska masa (kDa)	Bolezen, kjer se proteini VEB izražajo			
		BL (Burkittov limfom)	KNŽ (Karcinom nosno-žrelnega protora)	HB (Hodgkinova bolezen)	PTLB (Post-transplantacijska limfoproliferativna bolezen)
Epstein-Barr jedrni antigen (EBNA)					
EBNA1	65-97	+	+	+	+
EBNA2	75-105	-	-	-	+
EBNA3A	130-195	-	-	-	+
EBNA3B	145-160	-	-	-	+
EBNA3C	130-195	-	-	-	+
EBNA-LP	20-130	-	-	-	+
Latentni membranski protein (LMP)					
LMP1	58-63	-	+/-	+	+
LMP2A	54	-	+	+	+
LMP2B	40	-	+	+	+

EB jedrni proteini

EB virusne jedrne antigene (EBNAs) so prvič dokazali z antikomplementno imunofluorescenco v jedrih limfocitov B, ki so latentno okuženi z VEB (Reedman in Klein, 1973). Identificirali so jih kot šest ločenih proteinov: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C in EBNA-LP (angl.: leader protein) s skupno oznako EBNA 1-6, prevedenih iz dolge policistranske mRNK z alternativnim izrezovanjem.

- EBNA1 je kodiran z odprtim bralnim okvirjem *BamK* in vsebuje značilna 20-45 kDa velika glicin-alaninska ponovljiva zaporedja, ki variirajo v dolžini in so zato proteini različni med virusnimi izolati, variirajo med 65-85 kDa. Vzdržuje stanje latentne okužbe, veže se na nukleotidno zaporedje oriP, kjer se začne replikacija virusne DNK, kar pomeni, da je nujen za replikacijo virusa in na metafazni kromosom, da se virusni episom enakomerno porazdeli na hčerinske celice med delitvijo. Deluje tudi kot transaktivator drugih EBNA proteinov.
- EBNA2 je 86 kDa velik protein, ki je kodiran z odprtim bralnim okvirjem *BamWYH*. Ekspresija EBNA2 je potrebna za iniciacijo nesmrtnosti limfocitov B.

Je transkripcijski aktivator vsem drugim latentnim virusnim genom (LMP-1 in LMP-2) in celičnim genom (CD21, CD23 in onkogenom *c-fgr* ter *c-myc*).

- EBNA3A, EBNA3B in EBNA3C so družina sorodnih proteinov, ki jih kodira odprti bralni okvir BARF, z molekulsko maso 140-180 kDa. Vsi trije proteini inhibirajo transkripcijsko aktivacijo EBNA2-odgovornih genov in s tem uravnavajo delovanje proteina EBNA2. EBNA3A in EBNA3C sta nujno potrebna še za transformacijo limfocitov B.
- EBNA-LP je kodiran z odprtim bralnim okvirjem BWRF1, ki oblikuje vodilno zaporedje EBNA RNK. Zaradi multiplih ponovljivih regij v DNK EBNA-LP variira v dolžini (20-130 kDa). Protein je vključen v regulacijo transkripcije. Za transformacijo limfocitov B ni nujno potreben, jo pa v povezavi z EBNA2 okrepi (Crawford, 2004).

Latentni membranski proteini

- LMP1 je kodiran z genom BNLF1 in je glavni virusni onkogen; njegovo izražanje je inducirano z EBNA2. Protein se nahaja v plazemski membrani okuženih celic, kjer je povezan s citoskeletom. Vpleten je v transformacijo in proliferacijo limfocitov B, prepreči lahko programirano celično smrt in zaradi delecije 30 bp lahko poveča tumorigenost virusa.
- LMP2 sta dva integralna membranska proteina LMP2A in LMP2B, znana tudi kot terminalna proteina 1 in 2. Nastaneta z alternativnim izrezovanjem odprtega bralnega okvirja oz. episoma. LMP2A inhibira aktivacijo okuženih celic B in s tem še litično replikacijo virusa, kar omogoči preživetje in vzdrževanje latence. Funkcija LMP2B proteina še ni znana (Crawford, 2004).
- EBER sta dve majhni ne-poliadenilirani RNK. Ne kodirata proteinov, vendar sta potrebni za vzdrževanje latentnega stanja.

Izražanje genov latentne stopnje je možno na tri načine. Prve virusne antigene (EBNA2 in EBNA-LP) v okuženih limfocitih B lahko dokažemo z detekcijo že 12 ur po okužbi, v naslednjih 24 urah pa še vse preostale jedrne antigene; LMP1 dokažemo po 48 urah:

- latenca I : izražanje samo genov EBNA1 pri BL
- latenca II: izražanje genov EBNA1, LMP1, LMP2A pri KNŽ in HB
- latenca III: izražanje vseh latentnih genov pri transformiranih celičnih linijah

2.4.2.2 Proteini litične stopnje

Litični geni VEB kažejo visoko homolognost z drugimi geni herpesvirusov. Glede na čas prepisa med sintezo virusne DNK jih delimo na gene, ki se prepišejo pred (takojšnji-zgodnji in zgodnji geni) in gene, ki se prepišejo po virusni sintezi DNK (pozni geni). Njihovo prepisovanje poteka v treh časovnih zaporedjih. Vsako skupino proteinov aktivira predhodna skupina in jo ovira naslednja.

Takojšnji-zgodnji geni

Najprej se izrazita takojšnja-zgodnja gena: BZLF1 (Z) in BRLF1 (R), ki skupaj aktivirata zgodnje gene in vplivata na preklon iz latentne v litično okužbo limfocitov B.

Zgodnji geni

Takojšnjim-zgodnjim genom sledi izražanje približno 30 zgodnjih genov (virusna DNK polimeraza, timidinska kinaza, ribonukleotidna reduktaza, zgodnji antigen (EA), glavni vezavni protein DNK, alkalna eksonukleaza, idr.), ki so po funkciji encimi in potrebni za podvojevanje virusne DNK.

Prvi odkriti produkt zgodnjih genov je bil zgodnji antigen (EA), ki je sestavljen iz dveh različnih komponent: restriktivne (R), ki jo najdemo v citoplazmi in difuzne (D), ki jo najdemo v citoplazmi in v jedru. Ločimo ju lahko po občutljivosti na fiksative, ki jih uporabljamo pri imunofluorescenci: metanol in etanol komponento R uničita.

Pozni geni

Pozni geni kodirajo virusne kapsidne proteine (VCA), ki so ne-glikolizirani strukturni proteini virusa in glikoproteina gp350/220 ter gp110.

Bralni okvir BcLF1 kodira glavni kapsidni protein (VCA), ki ga najlažje določimo z IIF.

Glikoproteini VEB sodelujejo pri infektivnosti virusa in pri razširjanju virusa. Deset glikoproteinov, ki so jih že identificirali, je najpogostejše vstavljenih v membrano okužene celice in nekateri od njih postanejo kasneje komponente virusne ovojnice (membranski antigeni MA: gp350/220, gp110 in gp85).

- Glavni glikoprotein ovojnice gp350/220 (kodira ga bralni okvir BLLF1) omogoča pritrjevanje virusa na površino limfocitov B z vezavo na virusni receptor CR2 (označijo ga tudi s CD21). Protitelesa, ki se vežejo na gp350/220, preprečijo infekcijo. Ker zasedejo vezavno mesto na receprotju, lahko ta protein predstavlja v prihodnosti možnost za vključitev v cepivo.
- Gp110 (kodira ga bralni okvir BALF4) kaže homologijo z glikoproteinom gB virusa herpes simpleks (HSV). Nahaja se v jedru in citoplazemski membrani okužene celice, niso ga pa našli v ovojnici virusa.
- Gp 85 (kodira ga bralni okvir BXLf2) kaže homologijo z glikoproteinom gH HSV in omogoča zlitje virusne in celične membrane. Za transport na celično površino potrebuje še glikoprotein gp25 (ta kaže homologijo z gL HSV), v virusni ovojnici pa tvori kompleks še z gp42. Nastali trimolekularni kompleks v virusni ovojnici omogoči zlitje virusne in celične membrane ter vstop virusa v limfocite B. Gp42 pa ni potreben za infekcijo epitelijskih celic (Crawford, 2004).

2.4.2.3 Proteini, homologni človeškim beljakovinom

VEB kodira še homologe človeških interleukinov (IL)-10 (BCRF1, ki se v litičnem ciklu izrazijo pozno) in celične gene preživetja bcl2 (BHRF1 kodira zgodnji protein), ki naj bi bili pomembni za imunski odgovor in celično preživetje (Crawford, 2004).

2.5 OKUŽBE CELIC Z VEB

VEB je sposoben okužiti dve vrsti celic (slika 5): epitelijske celice v žlezah slinavkah in bele krvne celice limfocite B. Okužba z virusom se najprej razvije v žlezah slinavkah, od koder se večina virusov sprosti v slino in tako prenese naprej na druge ljudi. Okužba limfocitov B z virusom povzroči njihovo proliferacijo, ki jo kontrolira imunski sistem. Če ne pride do pravega imunskega odziva, so posamezniki podvrženi razvoju različnih oblik karcinoma. Limfociti B predstavljajo glaven rezervoar latentnega virusa, čeprav lahko latentno okužbo zasledimo tudi v makrofagih, aktiviranih limfocitih T, dendritičnih celicah in v epitelijskih celicah pljuč (Crawford, 2004). Virus, ki okuži celice, lahko celice prisili, da vstopijo v delitveni cikel in v proliferacijo, kar zelo poveča število celic, ki vsebujejo virusni genom ali pa se virus v celicah razmnožuje, pri čemer se sproščajo novi infektivni virusi, ki lahko okužijo še neokužene celice (Murray, 2001).

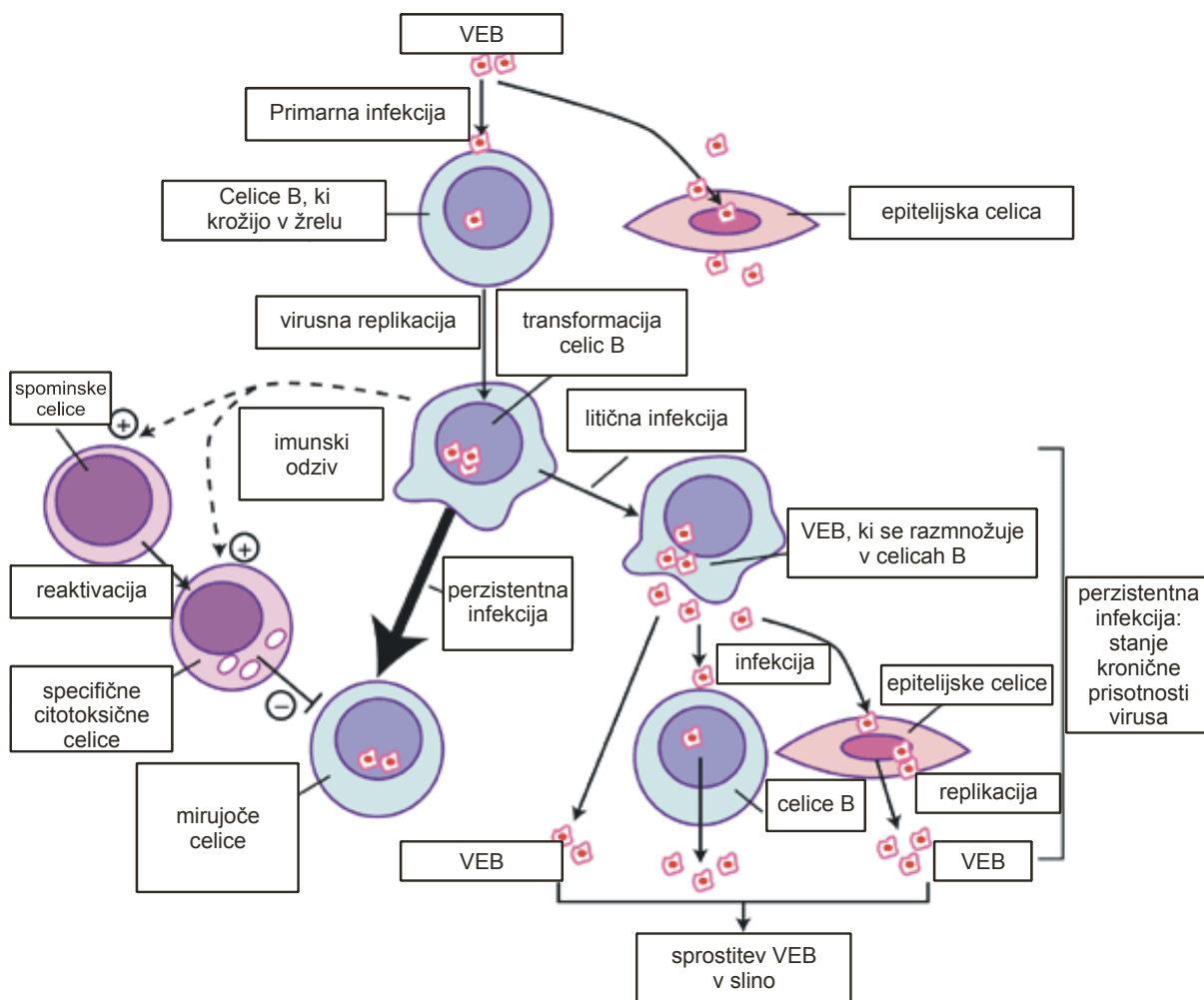
2.5.1 Okužba epitelijskih celic

VEB okuži epitelijske celice ustno-žrelnega prostora in materničnega vratu. Veže se na receptor CD2. Po vstopu v celico se prične pomnoževati in iz celice se sproščajo novi virioni, ki okužijo druge epitelijske celice ali pa najbližje limfocite B (Straus, 1993). V epitelijskih celicah najpogosteje poteka litična faza okužbe.

2.5.2 Okužba limfocitov B

Virus prične okužbo limfocitov B z vezavo ovojničnega glikoproteina gp350/220 na celični receptor CR2 oz. CD21, ki je hkrati tudi receptor za komponento komplekta C3d. Po vezavi na ustrezen receptor virus vstopi v celico z zlitjem oz. s fuzijo virusne ovojnice s celično membrano ali z endocitozo. Fuzijo omogoča kompleks glikoproteinov gp85-gp25-gp42 (Crawford, 2004). Po vstopu in slačenju potuje virusni genom v jedro okužene celice in vzpostavi se latentno stanje. Sledi zaokrožanje genoma oz. nastanek episoma, in izražanje latentnih genov.

Posledica takšne okužbe je, da virus po primarni okužbi ostane v telesu. Z virusom okuženi limfociti B izločajo imunoglobuline in rastne dejavnike. Ob motnji latence pa se lahko reaktivirajo in ponovno razmnožujejo. Dejavniki reaktivacije so lahko kemične snovi, oslABLJena imunska odzivnost in sočasna okužba z drugimi virusi (Crawford, 2004).



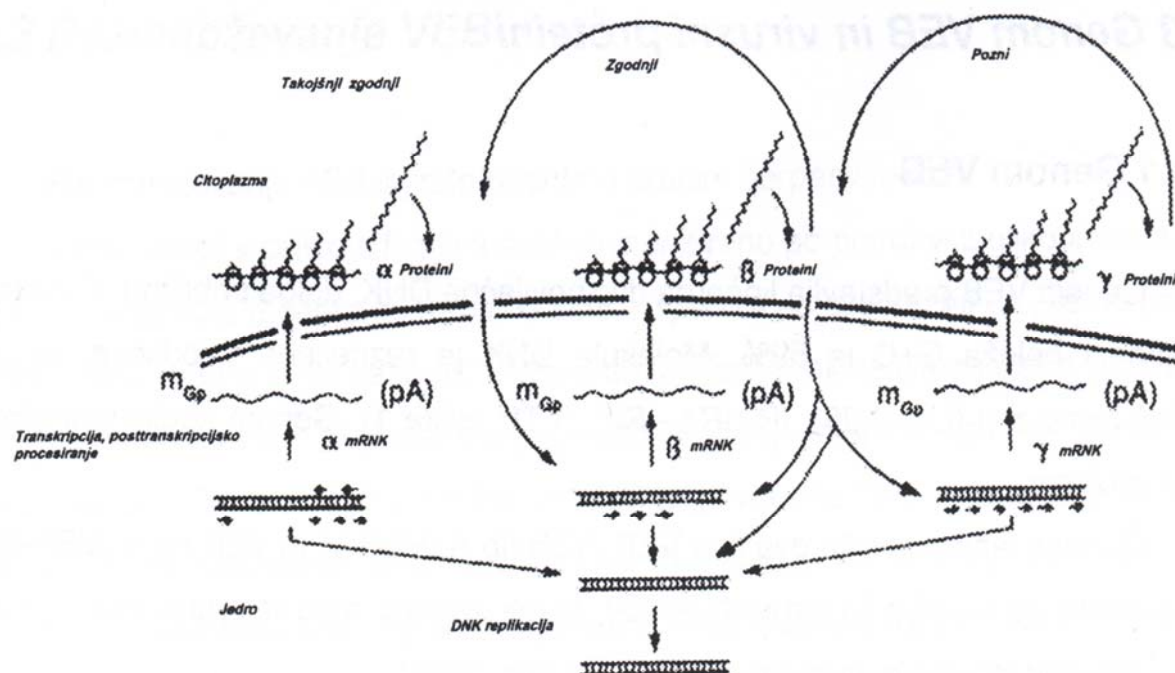
Slika 5: Okužbe celic z VEB (Murray, 2001)

2.6 RAZMNOŽEVANJE VEB

Razmnoževanje VEB je podobno razmnoževanju drugih herpesvirusov in poteka samo v živih celicah (v epitelijskih celicah nosno-žrelnega prostora in materničnega vratu, v limfocitih B, redko v limfocitih T in dendritičnih celicah) pri ljudeh in nekaterih primatih, ki imajo na svoji površini receptor CR2 oz. CR21 za VEB. Virusni genom ima ves zapis za izgradnjo virusa, vendar mora gostiteljska celica zagotoviti potrebno energijo in pogoje za izdelavo novih virusov.

Po pritrditvi virusa z glikoproteini na specifične celične receptorje, virus z zlitjem oz. s fuzijo virusne ovojnice s celično membrano vstopi v celico. Virusna kapsida se prenese po citoplazmi do jedrne pore, v jedro pa se prenese le sproščena virusna DNK, kjer se zaokroži in prevzame nadzor nad celično presnovo. Sledita dve transkripciji in dve translaciji, katerih rezultat so proteini alfa in beta (slika 6). Proteini alfa ali takojšnji-zgodnji proteini so regulatorni proteini, ki kontrolirajo ekspresijo zgodnjih in poznih genov. Proteini beta ali zgodnji proteini pa so encimi (timidinska kinaza, ribonukleotidna reduktaza), ki sodelujejo pri sintezi nukleotidov in encimi, potrebni za virusno replikacijo (DNK polimeraza, topoizomeraza, primaza, helikaza in drugi). Ti dve skupini encimov omogočita začetek replikacije virusne DNK, ki poteka z mehanizmom, imenovanim »rolling-circle«. Temu sledi še tretja transkripcija in translacija, v kateri se izrazijo pozni geni, ki se prevedejo v proteine gama. Proteini gama so strukturne komponente kapside. Na novo sintetizirana virusna DNK se končno vstavi v na novo nastalo kapsido in nastane nukleokapsida, ki se veže na notranjo jedrno membrano. Sledi brstenje virusnih delcev iz jedrne membrane, ki se obdajo z jedrno ovojnico. Premikajo se po cisternah endoplazemskega retikuluma proti celični membrani in se sprostijo z eksocitozo iz celice (White in Fenner, 1994).

Dolžina replikacijskega cikla variira pri herpesvirusih od 18 do 70 ur in celo več. Celice, okužene s herpesvirusi, vedno odmrejo, kar povzroči ustavitev sinteze gostiteljevih makromolekul.

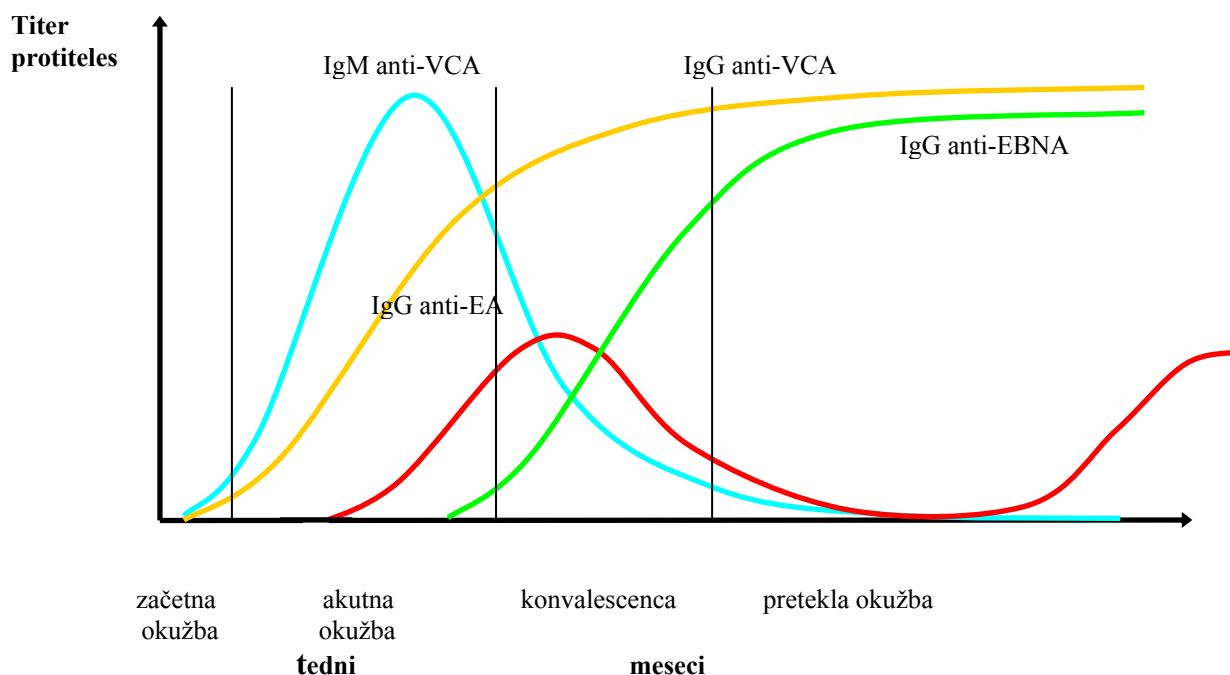


Slika 6: Prikaz transkripcije, translacije in replikacije DNK herpesvirusa (White in Fenner, 1994).

2.7 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO

2.7.1 Humoralni imunski odziv

Pri infekciji z VEB se aktivirajo limfociti B, kar vodi v sintezo različnih protiteles proti različnim virusnim antigenom (litičnim in latentnim antigenom ter proti ligandom na virusni ovojnici), kot tudi proti živalskim eritrocitom (heterofilna protitelesa pri IM se pojavijo v serumu zgodaj, vendar njihov odnos do virusa in njihova vloga še nista znani). Pomemben je še posebej nastanek nevtralizirajočih protiteles proti glikoproteinom virusne ovojnice gp350/220 in gp85, ki aglutinirajo virusne delce in s tem preprečijo nadaljnje širjenje virusa ter okužbe (Crawford, 2004). Po primarni okužbi se tvori tipičen vzorec protiteles (slika 7).



Slika 7: Značilna serološka reakcija bolnika na okužbo z VEB (Crawford, 2004)

S pojavom kliničnih znakov v serumu okuženih oseb najdemo protitelesa IgM proti VCA, redko IgA (ta najhitreje izginejo v nekaj dneh ali tednu dni, zato jih težko dokažemo, saj

takrat še ni kliničnih znakov, ki bi lahko vzbudili sum na okužbo) in IgG proti VCA ter protitelesa IgG proti EA in membranskemu antigenskem kompleksu.

S sledenjem specifičnih protiteles določimo različne stopnje okužb.

- **Akutna okužba** (Az = akutna zgodnja, A = akutna in Ap = akutna pozna okužba) je okužba z izraženimi kliničnimi znaki bolezni. Pride do močnega porasta protiteles IgM proti VCA (IgM anti-VCA), ki pa jih v nekaj tednih nadomestijo protitelesa IgG proti istemu antigenu (IgG anti-VCA). Ta se ohranijo doživljenjsko. Pojav protiteles IgG proti zgodnjemu antigenu EA (IgG anti-EA) je ponavadi zakasnel (vztrajajo nekaj tednov), v tem obdobju ni protiteles proti EBNA (anti-EBNA1).
- Med **konvalescenco** (K) oz. prebolevanjem bolezni koncentracije protiteles IgM anti-VCA in IgG anti-EA padejo nizko ali jih celo ne moremo določiti, navzoča so protitelesa IgG anti-VCA. Ponavadi med konvalescenco še ne določamo IgG anti-EBNA1.
- Pri **nedavni okužbi** (N) bolezenski znaki navadno izginejo, serološko pa lahko ugotovimo, da od začetka okužbe ni minilo več kot 3 do 6 tednov. Navzoča so samo protitelesa IgG anti-VCA in včasih tudi IgG anti-EA.
- **Pretekla okužba** (P) pomeni stik z virusom v preteklosti in ta oseba nima izraženih kliničnih znakov (od okužbe je minilo več kot 6 tednov). Za to obdobje so značilna protitelesa anti-EBNA1 in visoka koncentracija protiteles IgG anti-VCA. Protiteles IgM anti-VCA ter IgG anti-EA ni več.
- **Sekundarna anti-EBNA negativnost** (S) je značilna pri imunsko oslabljenih bolnikih (supresija celične imunosti, zdravljenje z imunosupresivnimi zdravili, okužba s HIV in drugo), kjer titri IgG anti-VCA in IgG anti-EA porastejo nespecifično, protitelesa proti EBNA pa lahko izginejo. Sekundarno anti-EBNA1 negativnost lahko napačno interpretiramo kot primarno okužbo. Z določanjem avidnosti protiteles IgG anti-VCA in IgG anti-EA lahko ločimo med primarno in sekundarno anti-EBNA1 negativnostjo.
- **Reaktivacija** virusa (R) poteka z ali brez bolezenskih znakov in to navadno pri imunsko pomanjkljivih osebah. Za njo so značilni visoki titri protiteles proti

litičnim antigenom (IgG anti-VCA in IgG anti-EA); virusi se iz limfocitov B sproščajo in napadajo nove limfocite B (Crawford, 2004).

2.7.2 Celični imunski odziv

Mehanizmi celičnega imunskega odziva omejujejo napredovanje virusa tako, da se klinični znaki okužbe običajno ne izrazijo. Že zelo zgodaj ob pojavu okužbe število okuženih celic močno naraste. V okužbo je vpletenih približno 20 % limfocitov B.

Najpomembnejša obramba proti okužbi z VEB so citotoksični limfociti T. Večina limfocitov T je iz razreda CD8⁺ (supresorski/citotoksični limfociti), nekaj je naravnih celic ubijalk (CD16) in celic T pomagalk (CD4). V času infekcije v krvi število CD8⁺ celic močno naraste ($15 \cdot 10^9/l$). Posledično pride do masovne produkcije citokinov (TNF- α , IL-1 in IL-6), ki izzovejo večino simptomov, značilnih za IM (Crawford, 2004). Tarča citotoksičnih limfocitov T so vsi proteini EBNA in LMP, izjema je le EBNA1 (problem je v primeru BL in KNŽ, ko virus sintetizira le en antigen in to EBNA1, ki ga limfociti T ne prepoznajo in tako ne napadejo okuženih celic). Posledica učinkovitega delovanja limfocitov T je, da virus preide v latentno fazo.

2.8 BOLEZNI, POVEZANE Z VEB

VEB je povzročitelj številnih bolezni, pri nekaterih pa še niso odkrili, ali je neposredni povzročitelj ali le spremljevalec. Med bolezni, povezane z VEB, spadajo IM, ki je izraz primarne okužbe, KNŽ in BL, ki se pojavita pri seropozitivnih posameznikih kot posledica spremenjenih celic, okuženih z VEB, ter druge limfoproliferativne motnje pri imunsko oslabljenih osebah, kot sta ustna lasasta levkoplakia (OHL) in limfoproliferativne bolezni pri seropozitivnih posameznikih, pri katerih imunosupresija omogoča, da se z virusom okužene celice nekontrolirano množijo. Povezujejo ga tudi z T-celičnimi limfomi, s HB, ne-Hodgkinovo boleznijo pri bolnikih z AIDS-om, z gladko-mišičnimi tumorji pri otrocih z imunsko pomanjkljivostjo (angl.: smooth-muscle tumors) in karcinomom želodca (Okano, 1998; Crawford, 2004).

2.8.1 Infekcijska mononukleoza (IM)

Infekcijska mononukleoza ali drugače žlezna vročina (angl.: glandular fever) je akutna samo-omejujoča limfoproliferativna bolezen (poznamo tudi kronično obliko bolezni). Najpogosteje se pojavlja pri mladostnikih in mladih odraslih ljudeh (starosti 15-25 let). Bolezen je pogostejša v višjih socialno-ekonomskih razredih in v zahodnih deželah, ker so bili posamezniki zaščiteni pred okužbo v otroštvu. Virus najpogosteje najdemo v odvzetih vzorcih sline in izpirkih žrela, kar kaže na prenos s slino pri otrocih, znotraj družine in mladostnikih, pa tudi v brisu materničnega vratu, kar kaže na možen prenos s spolnim stikom. Virus se lahko prenese tudi s transfuzijo okužene sveže krvi in s presaditvijo okuženih organov (Okano, 1998; Marolt-Gomišček, 1992; Crawford, 2004).

2.8.1.1 Akutna infekcijska mononukleoza

Akutno IM prepoznamo po bolezenskih znakih, ki se pojavijo 30-50 dni po okužbi (podobni so bolezenskim znakom gripe): vročina (traja največ 10 dni), glavobol, suho grlo (pojavi se pri 80-90 % bolnikov ter izgine po 7-14 dneh), otekline vratu, vnetje žrela (povzroča bolečine in težave pri požiranju); (slika 8), občutek slabosti, utrujenost, potenje,

anoreksija, abdominalne težave, limfadenopatija in včasih tudi izpuščaji. Značilno je tudi povečanje vranice in limfnih žlez (od tod tudi drugo ime žlezna vročina). Pri 25 % bolnikov s sekundarno okužbo so odkrili v žrelu β -hemolitične streptokoke, nekateri bolniki pa razvijejo znake, podobne hepatitisu. Izpuščaji se pojavijo v redkih primerih.



Slika 8: Vnetje žrela pri IM (Marquette University School of Dentistry, 2001)

Bolezen je omejena na posameznika in traja najpogosteje 1-2 tedna, lahko pa tudi do nekaj tednov. Gre za poliklonsko transformacijo celic B, ki sintetizirajo imunoglobuline A in G, pojavijo pa se tudi heterofilna protitelesa, ki reagirajo z antigeni na ovčjih eritrocitih. Je benigno obolenje, ki prizadene predvsem najstnike. Otroci in mladostniki (do 25. leta starosti) imajo manj tipične in blažje bolezenske znake. Običajno se bolezen pozdravi brez zdravljenja. Pri bolnikih nad 25. letom starosti so možne po 6 mesecih do 1 leta ponovitve bolezni, ki se izrazijo z vročino, suhim grlom in limfadenopatijo. Zakaj pride do tega, ni znano.

Med boleznijo se poveča število belih krvnih celic v krvnem obtoku, od katerih prevladujejo limfociti. Mnogi limfociti so veliki (10-20 μm v dolžino) in netipičnih oblik. Večina netipičnih limfocitov so aktivirani citotoksični/supresorski limfociti T CD8+, naravne celice ubijalke in aktivirane celice T CD4. Število limfocitov B ponavadi ostane nespremenjeno ali se rahlo poveča (1 okužena celica limfocita B na 10^4 - 10^5 limfocitov B). Pri starejših bolnikih z IM so bolezenski znaki hujši, lahko se pojavijo motnje v delovanju

jeter (pri 80-90 % vseh bolnikov), živčevja in ledvic, pri 30 % bolnikov se poveča tudi koncentracija bilirubina.

Ob akutnem obolenju so možni tudi zapleti (vendar so redki), kot so: poškodbe vranice, padec števila nevtrofilcev, hemolitična anemija, vnetje ledvičnih čašic, hepatitis, padec števila trombocitov, padec števila eritroblastov, meningitis, encefalitis, delirij, koma, miokarditis, redko tudi smrt (Brooks in sod., 2001; Crawford, 2004).

2.8.1.2 Kronična infekcijska mononukleoza

Pri kronični IM bolezenski znaki vztrajajo tudi več kot leto dni po primarni okužbi. Je redka oblika bolezni (1 primer na 2000 primerov IM), pogojena s stresom, zaužitjem alkoholnih pijač in različnih diet ter pogosto vodi v smrt zaradi odpovedi jeter in viremije.

Za kronično obliko IM so značilni visoki titri protiteles IgG proti virusnima proteinoma VCA in EA, ne razvijejo pa se protitelesa IgG proti EBNA1. V okuženem tkivu je virusni genom ves čas v večjem številu kopij. Bolezenski znaki so vročina, vnetje bezgavk, povečanje jeter in vranice, nagnjenost k zmanjšanju števila levkocitov in povečanju količine protiteles IgG (Okano, 1998; Crawford, 2004).

2.8.2 Burkittov limfom (BL)

VEB je povezan z razvojem Burkittovega limfoma (slika 9), ki se navadno razvije v tumor spodnje čeljusti. Je najpogostejši rak pri otrocih v centralni Afriki (Burkitt, 1958). Povprečna starost bolnikov z BL je 7,7-10,5 let. Po vstopu v telo VEB vstopi najprej v epitelne celice, nato pa v limfocite B, kjer povzroči genetske spremembe celic, ki se rakasto preoblikujejo (je rak limfocitov, oz. eden izmed ne-Hodgkinovih limfomov).



Slika 9: Burkittov limfom pri dečku (Koshi Medical School, 2005)

Danes poznamo tri vrste BL: endemični, neendemični in BL, ki nastane pri bolnikih z AIDS-om.

Endemični BL je razširjen v osrednji Afriki ter na Papui Novi Gvineji in je še danes najpogostejši maligni limfom dečkov, starih 3-15 let (povprečno 6-7 let; incidenca je 15/100.000/leto). Področje razširjenosti se ujema z razširjenostjo malarije (Brooks in sod., 2001), kjer na leto pade čez 60 cm dežja in je najnižja temperatura 16 °C (Lam, 1991). Navadno limfom nastane v spodnji čeljusti (slika 9), izjemoma v očnici, v osrednjem živčevju ali drugje. Neoplastične celice vsebujejo genom VEB v episomski obliki, bolniki pa imajo visok titer protiteles proti VCA, ki je povečan za 8-10 krat in hkrati proti zgodnjemu restrikcijскому antigenu (anti-EA-R). Visoke vrednosti teh protiteles so značilne že mesece ali leta pred pojavom bolezni. Neoplazme pa lahko nastanejo tudi čez več let ali več desetletij po primarni okužbi (de-Thé, 1978; Crawford, 2004).

Posamezni neendemični BL se pojavljajo v Evropi, Severni in Južni Ameriki ter severni Afriki. Pogostost je v primerjavi z endemično obliko 50-100 krat manjša. Navadno se pojavi pri obeh spolih, zbolevalo pa pretežno odrasli. Najpogosteje nastane v trebušni votlini, včasih pa tudi v spodnji čeljustnici in v očnici. Genom VEB je pri tej vrsti BL v celicah navzoč v 20 %.

V zadnjih desetih letih so odkrili še tretjo vrsto BL, ki se pojavi pri bolnikih z AIDS-om. Znano je, da so pri teh bolnikih bolj pogosti B-celični limfomi. Ko bolezen napreduje, se limfom pojavi razmeroma zgodaj, še pred popolno odpovedjo imunskega sistema.

Pomembna značilnost celic BL je, da so genetsko spremenjene. *C-myc* je normalen celični gen, ki kodira jedrni protein, katerega funkcija je celična aktivacija in proliferacija. Pri BL pa gre za lom kromosoma 8 blizu ali na mestu celičnega *c-myc*. Del kromosoma se premesti na kromosom 14 (izjemoma na kromosom 2 ali 22), na mesto, ki kodira sintezo težke verige imunoglobulinov. *C-myc* se na novem mestu intenzivneje izrazi in prevzame vlogo onkogeno. Sočasni okužbi s plazmodijem in posebno z virusom HIV pomenita dodaten dražljaj za proliferacijo limfocitov B, ki je živahna že po sami okužbi z VEB. Obe dodatni okužbi delujeta tudi zaviralno na celice T (Lam, 1991; Marin, 1999; Brooks in sod., 2001; Crawford, 2004).

2.8.3 Karcinom nosno-žrelnega prostora (KNŽ)

KNŽ je rak epitelijskih celic nosno-žrelnega prostora. Pojavlja se povsod (incidenca je 1/100.000/leto), vendar je najpogostejši v jugovzhodni Aziji-na jugu Kitajske (incidenca je tu 100-krat večja: 98 na 100.000 prebivalcev). Pogost je tudi med Eskimi (Aljaska, Grendlandija in Islandija), v severni in vzhodni Afriki, Maleziji, Indoneziji, Vietnamu in na Filipinih. Povprečna starost bolnikov je 20-50 let, razmerje moški proti ženskam je 2:1 (Brooks in sod., 2001). Je najpogostejši tumor pri moških in drugi najpogostejši pri ženskah. Tumor zraste v epitelijskih celicah nosno-žrelnega prostora, kjer pogosto miruje, metastaze pa se prenesejo v limfne žleze na vratu in pogost bolezenski znak so prav povečane oz. otekle in otrdele limfne žleze na vratu (slika 10). Če ni pravočasnega zdravljenja, lahko nastopi smrt zaradi oviranja dihanja (Crawford, 2004).



Slika 10: Povečane in otrdele limfne žleze na vratu bolnika s KNŽ (Hauser, 2000)

Povezavo z VEB so odkrili na osnovi seroloških raziskav, saj so bolniki imeli visoke titre protiteles IgA in IgG proti VCA, proti zgodnjemu difuzijskemu antigenu (anti-EA-D) in protitelesa proti EBNA. Prognostičen pomen imajo predvsem IgA anti-VCA. Ugotovili so, da ima 1-2 % Kitajcev trajno visok titer protiteles in da se prav pri njih z veliko verjetnostjo pojavi KNŽ. Ugotovili so tudi, da okoljski dejavniki, kot so prehrana (slane ribe, ki vsebujejo večje količine kancerogenih dušikovih spojin), tradicionalna zeliščna medicina (vohanje fosfornih estrov) in vrsta poklica, vplivajo na razvoj KNŽ. Dokazali so, da imajo Eskimi podobne prehranske navade kot Kitajci (Marin, 1999; Broks in sod., 2001).

2.8.4 Hodgkinova bolezen (HB)

VEB so dolgo povezovali s Hodgkinovo boleznijo (HB), ker so največkrat osebe, ki so prebolele IM, imele že mesece ali celo leta pred razvojem bolezni 2-3-krat večje titre protiteles proti virusnim litičnim antigenom. Povezava virusa z boleznijo še vedno ni potrjena, so pa dokazali DNK VEB v rakavih celicah. Še vedno ne vedo, ali je VEB pri HB

povzročitelj ali le spremljajoči dejavnik. Okužene celice izražajo EBNA1 in visoke koncentracije proteinov LMP1 in LMP2 (latenca II). Bolezen se pojavlja pri otrocih predvsem v deželah v razvoju (povprečna starosta 5-10 let) in pri starejših v razvitih deželah (povprečna starost 15-35 let). Večina primerov HB pri otrocih v deželah v razvoju je povezanih z VEB, v razvitih deželah pa pri otrocih prevladuje HB, ki ni povezana z VEB, ampak povezava z virusom narašča s starostjo. Bolezenski znaki so otečene limfne žleze na vratu, vročina, mrzlica, izguba telesne teže in apetita ter srbečica na koži (Jarrett, 2002; Crawford, 2004).

2.8.5 Okužbe z VEB pri imunsko pomanjkljivih osebah

Sposobnost VEB je, da lahko dolgo vztraja v limfocitih B in da se razmnožuje v slini v več kot 90 % celotne svetovne populacije. Perzistentno okužbo nadzirajo z VEB senzibilizirani citotoksični limfociti T in ko pade celična imunost, naraste sproščanje VEB v slino, titri protiteles proti litičnim antigenom (VCA in EA) se povišajo, virusi se prenesejo v limfocite krvnega obtoka. Temu stanju pravimo tudi reaktivacija virusa; navadno se bolezenski znaki ne pojavijo. Možni so pojavi limfoproliferativnih lezij in razvoj limfomov (T in B-celičnih) oz. ne-Hodgkinovih limfomov (pri bolnikih z AIDS-om, pri osebah z imunosupresivno terapijo po transplantacijah organov, idr.) (Crawford, 2004).

2.8.5.1 T-celični limfomi

Dokazali so, da je VEB v celicah T otrok s kronično IM in v nekaterih T-celičnih limfomih. Povezavo z VEB so dokazali pri treh različnih T-celičnih limfomih: prvi je hemofagocitni sindrom (VAHS; angl.: virus associated hemophagocytic syndrome), ki se razvije po prvi okužbi in za katerega velja, da histiociti fagocitirajo krvne celice; druga vrsta so limfomi nosne votline, kože in prebavil, ki so jih dokazali pri Evropejcih in pri Azijcih ter tretja vrsta, angioimunoblastna limfadenopatija (AILD; angl. angioimmunoblastic lymphadenopathy) in pleomorfni limfom s srednje velikimi in velikimi celicami. Delež celic z VEB genomom se večja z napredovanjem tumorja (Crawford, 2004).

2.8.5.2 B-celični limfomi

Na X kromosom vezan limfoproliferativni sindrom (X-LPS)

B-celični limfomi, ki se pojavljajo pri bolnikih s prirojeno in pridobljeno imunsko pomanjkljivostjo, so pogosto povezani s predhodno okužbo z VEB. Opisali so nekaj primerov prve okužbe z VEB pri mladih moških, ki imajo na kromosom X vezano imunsko pomanjkljivost, zaradi katere se zmanjša sposobnost sproščanja interferona gama, posledično pa pride do ekspanzije z VEB okuženih limfocitov B. Temu sindromu drugače pravimo Duncanov sindrom in so ga prvič odkrili leta 1974, okvarjeni gen pa leta 1998. Prizadeti bolniki ne morejo po okužbi z VEB ustvariti zadostnega imunskega odziva. Večina jih umre zaradi hude in smrtno IM kot posledica razpada jeter; pri manjšini bolnikov, ki preživijo, pa lahko napredujejo v kronično obliko in ostanejo prizadeti zaradi hipo- ali agamaglobulinemije in malignih limfomov. Približno pri polovici bolnikov že nekaj tednov po okužbi nastane limfoblastni maligni B-celični limfom, ki ima antigene VEB in se najpogosteje nahaja v centralnem živčnem sistemu in prebavnem traktu (Crawford, 2004).

Limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov in kostnega mozga (PTLD)

Iatrogene imunosupresije po presaditvi kostnega mozga ali organov stopnjujejo naraščanje pojavljanja tumorjev, ki so povezani z VEB. Ob presaditvi je pomemben bolnikov imunski odziv glede na VEB; tako so seronegativni prejemniki organov mnogo bolj ogroženi, saj lahko pridobijo okužbo s presadkom ali s transfuzijo krvi. Pri teh bolnikih so B-celični limfomi drugi najpogostejši tumorji (sledijo kožnim tumorjem) in imajo največjo zbolewnost in smrtnost. Pri več kot 10 % prejemnikov organov se razvije limfoproliferativna bolezen po presaditvi organov in kostnega mozga (PTLD) v obliki velikega celičnega limfoma. Rizični dejavnik pri teh bolnikih so imunosupresivna zdravila, ki jih prejemajo po presaditvi, da ne bi prišlo do zavrnitve organov. Čez 90 % bolnikov s PTLD je VEB-pozitivnih, tumorske celice pa večinoma izražajo vse latentne virusne gene (latenca III). Imunosupresivna terapija po transplantaciji organov ali krvnih celic inhibira z

VEB-senzibilizirane citotoksične limfocite T in poveča nekontrolirano proliferacijo z VEB okuženih limfocitov B. PTLID se pogosto izraža kot sindrom IM pri otrocih po presaditvi organov, pri kateri je okužen presaditveni organ in to največkrat v letu dni po presaditvi. Pri seropozitivnih bolnikih se bolezen redko razvije. Več let po transplantaciji se pojavijo limfomi v bezgavkah, črevesju, jetrih, osrednjem živčevju, lahko tudi na več mestih hkrati. Limfomske celice vsebujejo genom VEB. Po omejitvi oz. ukinitvi imunosupresivnega zdravljenja limfomi navadno izginejo (Crawford, 2004).

Limfomi pri bolnikih z AIDS-om

Pri bolnikih z AIDS-om je incidenca ne-Hodgkinovega limfoma med okuženo populacijo močno povečana. Limfomi se pojavijo v poznem obdobju, ko je imunski sistem oslabljen; tumorji so treh vrst:

- primarni limfom v centralnem živčnem sistemu (angl.: primary central nervous system lymphoma, PCNSL); je redek tumor populacije, ki ima povečano incidenco okužbe z virusom HIV. Pojavi se v pozni stopnji bolezni, ko je imunski sistem zelo pomanjkljiv.
- Burkittov limfom se pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, pojavi v zgodnji fazi, ko še imunska pomanjkljivost ni tako huda. Pojavlja se predvsem v endemični obliki v Afriki.
- periferni ne-Hodgkinov limfom se pojavlja v pozni stopnji okužbe z virusom HIV in navadno ne zajema žlez.

Druge vrste limfomov, ki vključujejo okužbo z virusom HIV, so: HB, ki kaže močno povezavo z VEB ter limfom, povezan z VEB in z virusom HHV-8.

Ustna lasasta levkoplakija (OHL)

Ustno lasasto levkoplakijo (OHL; angl.: oral hairy leukoplakia) so prvič odkrili pri seropozitivnih bolnikih, okuženih z virusom HIV. Za njo so značilne multiple benigne

lezije na jeziku, ki niso boleče (slika 11). Dovolj zgodnje zdravljenje z aciklovirom je lahko uspešno.



Slika 11: Benigne lezije na jeziku, posledica ustne lasaste levkoplakije (Libman in Barlam, 2002)

2.9 EPIDEMIOLOGIJA

VEB je pogost v vseh predelih sveta. V državah v razvoju pride do okužb že v zgodnjem otroštvu; več kot 90 % otrok je okuženih do drugega leta starosti. V tem obdobju običajno potekajo okužbe brez prepoznavnih bolezenskih znakov. V razvitih državah pa zaradi višjega socialno-ekonomskega in higienskega standarda pride do več kot 50 % okužb z VEB v obdobju odrasčanja. Do 25. leta starosti so skoraj vse odrasle osebe seropozitivne in neobčutljive za ponovne okužbe, lahko pa pride do reaktivacije virusa (Brooks in sod., 2001; Crawford, 2004).

V seroepidemioloških študijah so glavni pokazatelj okužbe z VEB protitelesa IgG proti VCA, ker se ta protitelesa pojavijo zgodaj po primarni okužbi in vztrajajo doživljenjsko.

IM je pogosta v populacijah z višjo socialno-ekonomsko stopnjo in to v razvitih deželah, ker so posamezniki pred različnimi okužbami boljše zaščiteni v otroštvu. V primerih, ko do primarne okužbe ne pride v otroštvu ali mladostništvu, se najpogosteje razvije bolezen IM.

BL se sporadično pojavlja po vsem svetu (v Evropi, Severni in Južni Ameriki ter severni Afriki). Pogostost je v primerjavi z endemično obliko 50-100 krat manjša, predeli z visoko incidenco pa so v osrednji Afriki in na Papui Novi Gvineji, kjer je tudi visoka koincidenca malarije. V endemičnem območju je BL najpogostejši rak dečkov, starih 3-15 let (povprečno 6-7 let; incidenca je 15/100.000/leto).

KNŽ se pojavlja povsod (incidenca je 1/100.000/leto), vendar je najpogostejši v jugovzhodni Aziji: v južni Kitajski (incidenca je tu 100-krat večja; 98 na 100.000 prebivalcev). Pogost je tudi med Eskimi (Aljaska, Grendlandija in Islandija), v severni in vzhodni Afriki, v Sredozemlju, Maleziji, Indoneziji, Vietnamu in na Filipinih.

HB se pojavlja pri otrocih predvsem v deželah v razvoju (povprečna starost 5-10 let) in pri starejših v razvitih deželah (povprečna starost 15-35 let). Večina primerov HB pri otrocih v deželah v razvoju je povezanih z VEB, v razvitih deželah pa pri otrocih prevladuje HB, ki ni povezana z VEB; povezava z virusom narašča s starostjo (Crawford, 2004).

2.9.1 Način prenosa virusa

Žleze slinavke so dokazano rezervoarji VEB. Virus se občasno širi z izločki zgornjih dihal. Širjenje se nadaljuje še nekaj mesecev po okužbi in nato postopoma upada. Prenos je večji v manj razvitih državah predvsem pri otrocih, zgodaj v nosečnosti in pri imunsko oslabljenih osebah (prejemniki organov, bolniki z AIDS-om)

Virus se z vironosca na zdravega človeka širi s slino in kapljicami (poljubljanje in kašljanje). Mogoč je tudi prenos s spolnim stikom, redkeje s transfuzijo krvi ali s presaditvijo organov in kostnega mozga (Crawford, 2004). Nedavno so virus odkrili tudi v mleku doječih mater, kar predstavlja novo pot širjenja (Junker, 1991).

2.9.2 Razširjenost VEB v Sloveniji

V Sloveniji je bila narejena raziskava (tri zaporedna leta 1985, 1986 in 1987), kjer so določali stopnjo prekuženosti zdrave populacije z VEB. Pri preiskovanih osebah so določali protitelesa IgG anti-VCA. Rezultati raziskave so pokazali visok odstotek prekuženosti majhnih otrok (55 %), kar kaže na sorazmerno nizko raven socialno-ekonomskega razvoja in visok odstotek pri odraslih po tridesetem letu starosti (93 %). Prvi stik z virusom doživi 35 % otrok do petega leta starosti, naslednji vrh prvega stika pa predstavljajo mladostniki po dvajsetem letu (20-30 %). Približno pri polovici bolnikov (53,2 %) primarno okužbo spremlja sindrom IM, pri drugi polovici pa je klinična slika neznačilna – navadno z enim očitnejšim bolezenskim znamenjem (okvara delovanja jeter na prvem mestu) ali brez (Marin, 1990).

2.10 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽB Z VEB

2.10.1 Zdravljenje

Študije so pokazale, da širjenje virusa iz nosno-žrelnega prostora preprečimo pri bolniku z IM z oralno uporabo aciklovira v visokih odmerkih ali z intravensko aplikacijo (Brooks in sod., 2001; Crawford, 2004). Zmanjšamo virusno razmnoževanje, ne skrajšamo pa časa bolezni in to najverjetneje, ker so simptomi imunopatološke narave in niso povzročeni neposredno z virusno okužbo limfocitov B. Pogosto bolezen spremlja suho grlo, ki je zelo boleče in so zato potrebni še analgetiki (aspirin, paracetamol,...). V hudih primerih, če pride do oviranja žrela in sapnika, ter nevroloških in hematoloških zapletov, so v pomoč tudi kortikosteroidi, ki skrajšajo resnost in potek bolezni (Crawford, 2004).

BL je zelo občutljiv na kemoterapijo in ponavadi je že en odmerek ciklofosfamida dovolj za regresijo tumorja. Vendar je možen ponovni pojav BL, takrat je zdravljenje manj uspešno, zato je najbolje izpeljati celotno terapijo zdravljenja. Pri bolnikih z AIDS-om je zaradi dodatne okužbe z virusom HIV zdravljenje s ciklofosfamidom manj učinkovito, zato te bolnike izpostavijo žarkom-X (radioterapiji), ki zmanjšajo tumor (Crawford, 2004).

KNŽ je težko zdraviti s kirurško odstranitvijo, ker so zgodnje metastaze najpogostejše v predelih limfnih žlez. Tumor je odporen na kemoterapijo, zato je edina možnost zdravljenja primarnih tumorjev in tumorjev vratnih žlez z radioterapijo. Napovedi zdravljenja so slabe. Petletno obdobje preživetja za zgodnjo stopnjo bolezni je okrog 60 % (Crawford, 2004).

HB je možno uspešno zdraviti (predvsem v zgodnji stopnji) z radioterapijo in kemoterapijo, v kolikor je tumor omejen na določeno mesto. Če je tumor omejen na en limfni vozle, se uspešno pozdravi 90 % bolnikov v času 10 let in 70 % bolnikov v istem času, če je tumor omejen na 2 limfna vozla. V kolikor bolezen napreduje, predstavlja kemoterapija primarno obliko zdravljenja in potrebni so večji odmerki zdravil (Crawford, 2004).

Ne-Hodgkinove limfome zdravimo s kemoterapijo v kombinaciji z zdravili proti raku, s kirurško odstranitvijo tumorja iz želodca in drugih nenavadnih mest, z radioterapijo in presaditvijo kostnega mozga v primeru zdravljenja z močnimi zdravili (Crawford, 2004).

Mnoge študije dokazujejo, da je intravenska ali oralna uporaba aciklovira učinkovita pri zdravljenju ustne lasaste levkoplakije, vendar se lezije po prekinitvi zdravljenja pogostokrat ponovno pojavijo.

2.10.2 Preprečevanje

Prenos VEB lahko preprečimo z omejevanjem intimnega dotika. S tem preprečimo okužbo majhnih otrok; do primarne okužbe zelo verjetno pride kasneje. Dodatno težavo predstavlja asimptomatsko širjenje virusa po akutni okužbi. Izogibanje okužbi je priporočljivo le v primerih, ko so zapleti lahko usodni (Crawford, 2004).

V primeru endemičnega BL je potrebno izkoreniniti malarijo, kar je bilo do danes uspešno izvedeno na nekaterih manjših otokih Papue Nove Gvineje.

Bolnišnični prenos VEB se večinoma preprečijo z upoštevanjem splošnih pravil bolnišnične higiene. Osamitev oseb z akutno IM običajno ni potrebna. V posebnih primerih (prejemniki organov, otroci s hudimi imunskimi pomanjkljivostmi) priporočajo pri seronegativnih prejemnikih uporabo organov seronegativnih dajalcev.

2.10.2.1 Cepiva proti VEB

Večina bolezni, katerih povzročitelj je VEB oz. je pri njih prisoten, je zelo resnih in mnoge izmed njih se končajo s smrtnim izidom. Žal še nimamo specifičnih protivirusnih učinkovin za preprečevanje ali zdravljenje okužbe z VEB, vendar je glavni namen raziskav, da bi preprečili okužbe v predelih sveta, kjer so rakava obolenja, povezana z VEB, endemična.

Vse od odkritja VEB se trudijo, da bi razvili cepiva, ki bi preprečila primarne okužbe z virusom in obe obliki cepiv, ki so ju izdelali, sta v začetnih fazah testiranja.

- Antigen, ki so ga izbrali za razvoj enega izmed cepiv je MA gp350/220, ki se nahaja v ovojnici viriona in v plazemski membrani virusa. Nevtralizirajoča protitelesa, ki prepoznajo ta MA, nevtralizirajo tudi virus (Khanna in sod., 1999). Gre za rekombinantno cepivo virusa vakcinije, kateremu so vgradili promotor za MA gp350/220 (Gu, 1995).
- Drugo cepivo, ki so ga pripravili, temelji na sintetičnem peptidu, podobnem virusnemu antigenu EBNA3 in ta inducira odgovor citotoksičnih celic T (Khanna in sod., 1992; Moss in sod., 1998; Crawford, 2004).

Vse raziskave o kandidatih za dobra cepiva proti VEB so pokazale, da sta cepivi varni in, da ju ljudje dobro prenašajo. Potrebno pa bo še ogromno dela, da bodo cepiva prišla na trg.

2.11 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VEB

Raziskave so pokazale, da so postopki, ki so na voljo za diagnozo bolezni, povezanih z VEB in interpretacija diagnostičnih rezultatov odvisni od bolezni same in od stopnje okužbe.

Za dokazovanje okužb z VEB imamo na razpolago več diagnostičnih metod, s katerimi dokazujemo virus neposredno ali dokažemo okužbo na posreden način (Okano 1998); (preglednica 3).

2.11.1 Neposredne metode dokazovanja VEB

Neposredno dokazujemo virus z izolacijo (redko), z dokazovanjem virusne DNK (molekularno-biološka metoda: verižna reakcija s polimerazo oz. PCR, hibridizacija po Southernu (odtis Southern) in hibridizacija *in situ*), z dokazovanjem virusa v tkivih (histološki preparati – elektronska mikroskopija), z dokazovanjem virusnih beljakovin (direktna imunofluorescenca) in s hematološkimi preiskavami krvi.

Poskus izolacije virusa iz kužnine je zahteven postopek in ga v diagnostiki ne uporabljamo. Poskus predstavlja zahtevno delo, ki je največkrat brez prave koristi za bolnika, saj 10-20 % zdravih ljudi izloča virus s slino in nekaterimi izločki (Marin, 1990).

2.11.2 Posredne metode dokazovanja VEB

Posredne metode, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa bolnika proti VEB, so različni serološki testi, med katere prištevamo: Paul-Bunnellova reakcija, imunofluorescenčni testi (indirektna imunofluorescenca-IIF, antikomplementna imunofluorescenca-ACIF), encimsko imunski test z rekombinantnimi antigeni (ELISA), imunska blot metoda (odtis Western) in kemiluminiscenčni testi (CLIA).

Posredna oz. indirektna imunofluorescenca (IIF) je skoraj tri desetletja predstavljala vodilno diagnostično metodo za dokazovanje različnih protiteles. Razni poskusi encimsko

imunskih testov z istimi antigeni, kot so jih uporabljali pri IIF niso pomenili kakovostnega premika. Šele uporaba rekombinantnih antigenov predstavlja možnost natančnejšega določanja okužb z VEB. Danes prevladujejo za klinično uporabo encimsko imunski test ELISA, s katerim dokazujemo protitelesa proti nativnim in rekombinantnim antigenom, vezanim na trden nosilec (Marin, 1995).

Diagnostika IM temelji na prepoznavnih bolezenskih znakih in hematološki preiskavi krvi, v kateri najdemo atipične monocite; od tod ime mononukleoza. Glavna diagnoza temelji na seroloških preiskavah (dokaz specifičnih protiteles proti specifičnim antigenom). Protitelesa IgM anti-VCA, IgG anti-EA (D) brez navzočih IgG anti-EBNA1 potrdijo primarno okužbo. Komercialni testi ELISA so v veliki uporabi, vendar so manj občutljivi kot tradicionalen indirektni imunofluorescenčni test. Lažno-pozitivni rezultati protiteles IgM so lahko posledica nespecifične vezave med specifičnimi IgM in revmatoidnim faktorjem. Če je ta faktor v serumu, ga je potrebno prej odstraniti, da ne moti meritev. Z uporabo rekombinantnih antigenov je možnost lažno pozitivnih rezultatov zelo zmanjšana.

Kemiluminiscenčna metoda (CLIA) je nova metoda, ki je v osnovi podobna encimsko imunski metodi (ELISA). Protitelesa, ki jih določamo, dokažemo v kompleksu, na katerega je konjugiran izoluminolni derivat.

VEB spodbudi tudi nastanek nespecifičnih heterofilnih protiteles, ki so v večini iz razreda IgM. Obstajajo različni testi za hitro določanje teh protiteles. Imajo orientacijske vrednosti; vedno pogosteje jih nadomeščajo specifični testi za dokaz protiteles proti VEB (Okano in sod., 1988; Okano, 1998).

Diagnoza BL v endemičnih predelih temelji predvsem na tipičnih bolezenskih znakih in histološkem pregledu odvzetega vzorca tumorja. Tumor kaže značilne histološke spremembe (Burkitt, 1958).

Za diagnozo KNŽ so potrebni bioptični materiali iz predelov primarnih tumorjev in povečanih vratno limfnih žlez. Epitelijske celice karcinoma delimo po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije v tri histološke tipe: lepo vidne luskave rakaste

epitelijske celice z interceličnimi mostovi in/ali keratinizacijo, ne-keratinizirane celice in težko prepoznavne rakaste celice, v katerih so pogosto limfociti in velikokrat vodijo v napačno diagnozo. Za potrditev diagnoze in njen potek se določajo tudi titri protiteles proti virusnim antigenom. Prognostično vrednost imajo zlasti protitelesa IgA anti-VCA (Crawford, 2004; Klemenc, v tisku).

Preglednica 3: Diagnostični postopki za dokazovanje okužb z VEB (Okano, 1998)

Test	Metoda
<i>Serologija:</i> IgG, IgM in IgA anti-VCA IgG in IgA anti-EA(D) IgG anti-EA(R) IgG anti EBNA heterofilna protitelesa IgM	posredna imunofluorescenca, ELISA, odtis Western Paul-Bunnell-Davidsohnov test
<i>Detekcija proteinov in genoma VEB:</i> EBNA, LMP EBER VEB-DNK	imunofluorescenca, odtis Southern, odtis Western, hibridizacija <i>in situ</i> PCR, hibridizacija <i>in situ</i> , odtis Southern
<i>Drugo:</i> vzpostavitev VEB pozitivne celične linije dokaz viriona	kultura elektronska mikroskopija

6 MATERIAL IN METODE

6.1 MATERIAL

6.1.1 Zbiranje in shranjevanje kliničnih materialov

V raziskavo smo vključili 100 arhivskih vzorcev (99 serumov in 1 likvor) bolnikov s sumom na okužbo z VEB iz strokovne dejavnosti Laboratorija za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V teh serumih in likvorju smo ugotavljali imunski odziv na okužbo z VEB. Primerjali smo dve metodi: encimsko imunsko metodo (ELISA), ki jo uporabljajo za vsakodnevno diagnostično dejavnost in še ne preizkušeno kemiluminiscenčno metodo (CLIA). Z obema metodama smo določali protitelesa IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA, IgG anti-EA in njihove koncentracije ter opredelili stopnjo virusne okužbe.

Vzorci serumov in likvorja smo hranili v zaprtih plastičnih epruvetkah v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Pred uporabo smo vzorce odtalili pri sobni temperaturi in jih previdno premešali.

Bolniki, katerih serume in likvor smo vključili v preiskavo, so bili stari od 2 mesecev do 92 let; pripadali so 45 moškim in 55 ženskam. Bili so iz različnih področij Slovenije.

6.1.2 Oprema, testni kompleti in reagenti za encimsko imunsko metodo (ELISA)

Za izvedbo encimsko imunskega testa (ELISA) smo uporabili aparaturo ETI STAR TM (slika 12) proizvajalca DiaSorin in komercialno pripravljene komplete za določitev posamezne vrste protiteles: ETI-EVB-M reverse (P001605) za določitev IgM anti-VCA, ETI-VCA-G (P001606) za določitev IgG anti-VCA, ETI-EBNA-G (P001607) za določitev IgG anti-EBNA in ETI-EA-G (P002093) za določitev IgG anti-EA.

Komercialno pripravljene diagnostične komplete vsebujejo:

- **mikrotitersko ploščico** z 12 preničnimi stolpci, v vsakem je 8 vdolbinic; v vdolbinicah je trdno vezan specifičen rekombinantni antigen (sintetični polipeptid p18 za določitev IgM anti-VCA, p18 za določitev IgG anti-EBV in EBNA-1 za določitev IgG anti-EBNA ter rekombinantni polipeptid EA(D) za določitev IgG anti-EA)
- **kalibratorje** (2,5 ml) (preglednica 4)
- **sekundarna protitelesa**, uperjena proti posameznemu virusnemu antigenu, konjugirana z encimom (15 ml) (preglednica 5)
- **razredčevalno sredstvo za sekundarna protitelesa** (preglednica 5)
- **razredčevalno sredstvo za testne vzorce** (2x50 ml)-vsebuje fosfatni pufer (PBS), BSA, Triton X-705, Tween 20, stabilizatorje, konzervanse in inertno rdeče barvilo
- **izpiralni pufer** (40 ml)-vsebuje PBS, Tween 20 in konzervans
- **kromogen/substrat** (16 ml)-sistem tetrametilbenzid/vodikov peroksid, ki vsebuje dimetil sulfoksid
- **reagent za ustavitev reakcije** (30 ml)-0,4N H₂SO₄



Slika 12: Aparatura ETI-STAR TM proizvajalca Dia Sorin

Sestavni del aparature je računalnik (vnos podatkov, poseben program, izpis rezultatov).

Priprava reagentov:

- sekundarna protitelesa pred uporabo razredčimo z razredčevalnim sredstvom 1:50, količina je odvisna od števila serumov in likvorjev, ki jih testiramo; ostanek zavržemo
- izpiralni pufer (koncentrat vsebuje PBS, Tween 20 in konzervanse) - 40 ml koncentrata razredčimo v 1 litru destilirane vode; lahko ga uporabljamo 1 teden, če ga hranimo pri temperaturi 2-8 °C; če postane moten, ga zavržemo
- drugi reagenti so že pripravljene za uporabo

Kontrolo postopka predstavljajo v test vključeni kalibratorji z znanim številom arbitrarnih enot (AU/ml). Z njimi računalnik izriše umeritveno krivuljo, ki nam služi kot mejna kontrola za posamezno specifično protitelo v serumu in likvorju (preglednica 4). Za vsako protitelo rabimo 4 kalibratorje različnih znanih koncentracij.

Preglednica 4: Kalibratorji za izvedbo testa ELISA (DiaSorin-Navodila za aparaturo ETI-STAR TM, 2000)

Vrsta kalibratorja	Vsebina kalibratorja
4 kalibratorji (2,5 ml) za IgM anti-VCA	Človeški serum, ki vsebuje sintetični peptid p18 proti IgM anti-VCA, PBS, BSA, stabilizatorje in konzervanse. Koncentracije so: 5, 20, 80 in 140 AU/ml.
4 kalibratorji (2,5ml) za IgG anti-VCA	Človeški serum, ki vsebuje sintetični peptid p18 proti IgG anti-VCA, PBS, BSA, stabilizatorje in konzervanse. Koncentracije so: 10, 20, 110 in 170 AU/ml.
4 kalibratorji (2,5 mL) za IgG anti-EBNA	Človeški serum, ki vsebuje sintetični peptid EBNA-1 proti IgG anti-EBNA, PBS, BSA, stabilizatorje in konzervanse. Koncentracije so: 5, 20, 110 in 200 AU/ml.
4 kalibratorji (2,5ml) za IgG anti-EA	Človeški serum, ki vsebuje rekombinantni polipeptid EA proti IgG anti-EA(D), PBS, BSA, stabilizatorje in konzervanse. Koncentracije so: 5, 20, 70 in 130 AU/ml.

Preglednica 5: Konjugati in razredčevalna sredstva za sekundarna protitelesa (DiaSorin-Navodila za aparturo ETI- STAR TM, 2000)

Vrsta protiteles, ki jih določamo	Sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom (konjugat)	Vsebina razredčevalnega sredstva za sekundarna protitelesa
IgM anti-VCA	Podganja monoklonska protitelesa IgG proti VCA sintetičnemu peptidu p18, konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP); dodani še pufer MES, BSA, stabilizatorji in konzervansi.	Liofiliziran VCA sintetični peptid p18, pufer MES, BSA, podganja IgG, stabilizatorji in konzervansi.
IgG anti-VCA	Gosja monoklonska protitelesa IgG, uperjena proti človeškim protitelesom IgG, konjugirana s HRP; dodani pufer TRIS, BSA, stabilizatorji in konzervansi	Gosji serum, PBS, BSA, stabilizatorji in konzervansi.
IgG anti-EBNA	Gosja monoklonska protitelesa IgG, uperjena proti človeškim protitelesom IgG, konjugirana s HRP; dodani pufer TRIS, BSA, stabilizatorji in konzervansi.	Gosji serum, PBS, BSA, stabilizatorji in konzervansi.
IgG anti-EA	Gosja monoklonska protitelesa IgG, uperjena proti človeškim protitelesom IgG, konjugirana s HRP; dodani pufer TRIS, BSA, stabilizatorji in konzervansi.	/

Vse reagente do predpisanega datuma uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C. Pred uporabo jih ogrejemo na sobno temperaturo, po uporabi pa zavržemo.

Za posamezen test rabimo 500 µl vzorca.

Postopek traja 3-4 ure.

3.1.3 Oprema in reagenti za kemiluminiscenčno metodo (CLIA)

Za izvedbo kemiluminiscenčnega testa (CLIA) smo uporabili aparaturu LIAISON (slika 13) proizvajalca DiaSorin in ustrezne komercialne reagente za določitev naslednjih vrst protiteles: IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA in IgG anti-EA.



Slika 13: Aparatura LIAISON proizvajalca DiaSorin

Vsi reagenti za določitev posameznih protiteles so vloženi v posebna stojala-integrali (slika 14). Posamezni integrali so označeni s črtnimi kodami, da jih aparat prepozna in vsebujejo (količinsko za 100 testov):

- **magnetne delčke** (2,3 ml), obdane s specifičnimi virusnimi antigeni: VCA sintetični polipeptid p18 za določitev IgM anti-VCA, p18 za določitev IgG anti-VCA in EBNA-1 za določitev IgG anti-EBNA ter rekombinantni polipeptid EA(D) za določitev IgG anti-EA. Dodani so BSA, fosfatni pufer in 0,1 % natrijev azid.
- **kalibrator 1** (3,2 ml): človeški serum (plazma) z nizko koncentracijo posamezne vrste protiteles (IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA in IgG anti-EA(D)). Dodani so BSA, fosfatni pufer, konzervans in neaktivno rumeno barvilo.
- **kalibrator 2** (3,2 ml): človeški serum (plazma) z visoko koncentracijo posamezne vrste protiteles (IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA in IgG anti-EA(D)). Dodani so BSA, fosfatni pufer, konzervans in neaktivno modro barvilo.

- **konjugat** (23 ml): mišja monoklonska protitelesa proti človeškim protitelesom, konjugirana z izoluminolnim derivatom. Dodani so BSA, fosfatni pufer in konzervansi.
- **razredčevalno sredstvo** (2 x 28 ml) v posebni posodici v integralu (za določitev protiteles IgG): fosfatni pufer, dodan BSA, konzervans in neaktivno rumeno barvilo.
- **pufer A** (25 ml) v posebni posodici v integralu (za določanje protiteles IgM). Z njim redčimo vzorce.



Slika 14: Komerčni reagentni integrali in reakcijske posodice (DiaSorin-Navodila za aparaturo LIAISON, 2002)

Integrale z reagenti do roka uporabe hranimo zaprte v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C in jih pred uporabo horizontalno nežno in previdno pretresemo, da se delci enakomerno porazdelijo in šele takrat odstranimo pokrove. Ko so enkrat že odprti, lahko ostanejo v uporabi do 8 tednov in jih hranimo v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C.

Sestavni deli aparature so še računalnik (vnos pozicij vzorcev, integralov,..., izpis rezultatov), stojala za vzorce in različne posodice (reakcijske, odpadne).

Za posamezen test potrebujemo 20 µl vzorca. Od vstavitve vzorca do prvih rezultatov preteče 35 minut.

3.1.3.1 Kalibracija aparature

Kalibracijo izvajamo:

- ko prvič uporabimo nove reagente v integralu
- če je od zadnjega kalibriranja preteklo več kot 4 tedne
- če je bil aparat med dvema testoma servisiran in
- če kontrolne vrednosti kalibratorjev ležijo izven dovoljenih mej

6.2 METODI

Vse vzorce (serume in likvor) smo testirali z encimsko imunskim testom (ELISA) na aparaturi ETI STAR TM, DiaSorin in s kemiluminiscenčnim testom (CLIA) na aparaturi LIAISON, DiaSorin.

6.2.1 Encimsko imunski test (ELISA)

3.2.1.1 Postopek testa

Pred izvedbo testa v avtomatski aparaturi ETI STAR TM smo zagotovili, da je bilo v aparaturi dovolj veliko število epruvet in segreli serume, likvor, diagnostične komplete ter reagente na sobno temperaturo (20-25 °C). Nerazredčene vzorce smo vstavili v stojalo v aparaturi, kjer so posebne epruvete za razredčevanje vzorcev. Aparatura ima tudi nastavek za posodice, v katere smo vstavili ustrezne količine posameznih kalibratorjev (glede na število testnih vzorcev), razredčevalo sredstvo za vzorce, sekundarna protitelesa konjugirana z encimom, kromogen/substrat, reagent za ustavitev reakcije in v poseben prostor še mikrotitersko ploščico z vezanimi antigeni v vdolbinicah (1 ali 2, odvisno od števila vzorcev).

V računalnik smo vnesli vse potrebne podatke (število vzorcev, vrsta testa, ...) in vključili aparat. Aparatura je vnesla v eno vdolbinico kromogen/substrat (slepa vdolbinica), v 4 vdolbinice kalibratorje različnih koncentracij za posamezno vrsto protiteles in v preostale vdolbinice vzorce.

Ker smo določali 4 vrste protiteles, smo zasedli od 96 vdolbinic na mikrotiterski ploščici 4 za slepe vdolbinice in 16 vdolbinic za kalibratorje. Druge so nam ostale za vzorce.

Potek testa v aparaturi:

- aparatura redči vzorce in kalibratorje ter jih po 100 μ L prenese v vdolbinice na mikrotiterski ploščici
- sledi 1-urna inkubacija pri 37 °C
- spiranje z izpiralnim pufrom
- dodajanje 100 μ l sekundarnih protiteles
- 1-urna inkubacija pri 37 °C
- spiranje z izpiralnim pufrom
- dodajanje 100 μ l raztopine kromogen/substrat
- 30-minutna inkubacija pri sobni temperaturi
- dodajanje 200 μ l reagenta za ustavitev reakcije
- merjenje absorbance pri valovni dolžini 450/630 nm

3.2.1.2 Način podajanja rezultatov

Računalnik po izmerjenih absorbancah kalibratorjev izriše umeritveno krivuljo za posamezno vrsto specifičnega protitelesa. Na os X nanaša znane koncentracije 4 kalibratorjev, na os Y pa njihove izmerjene absorbance ter določi mejno vrednost. Za 3 vrste protiteles (IgM anti-VCA, IgG anti-VCA in IgG anti EBNA), ki smo jih določali v naših vzorcih, je bila določena mejna vrednost 20 AU/ml, za IgG anti-EA pa 40 AU/ml (preglednica 6).

Iz umeritvene krivulje neposredno odčita koncentracijo protiteles (x) v vsakem vzorcu. Rezultat je za vsako vrsto protiteles izpisan kot pozitiven ali negativen (preglednica 6), pri pozitivnih vpiše tudi število arbitrarnih enot na mililiter seruma (AU/ml). Navadno dodamo še komentar, kjer glede na rezultate serološki status okužbe z VEB opredelimo kot: negativen, akutna zgodnja okužba, akutna okužba, akutna pozna okužba, konvalescenca, nedavna okužba, pretekla okužba, sekundarna EBNA-negativnost, reaktivacija, kronična okužba in od matere pasivno prenesena protitelesa IgG.

Preglednica 6 : Mejne vrednosti encimsko imunskega testa ELISA (DiaSorin-Navodila za aparaturo ETI-STAR TM, 2000)

Vrsta protitelesa	Negativen rezultat (neg.) (AU/ml)	Mejni rezultat (AU/ml)	Pozitiven rezultat (poz.) (AU/ml)
IgM anti-VCA, IgG anti-VCA in IgG anti-EBNA	$x < 20$	$x \cong 20$	$x > 20$
IgG anti-EA	$x < 40$	$x \cong 40$	$x > 40$

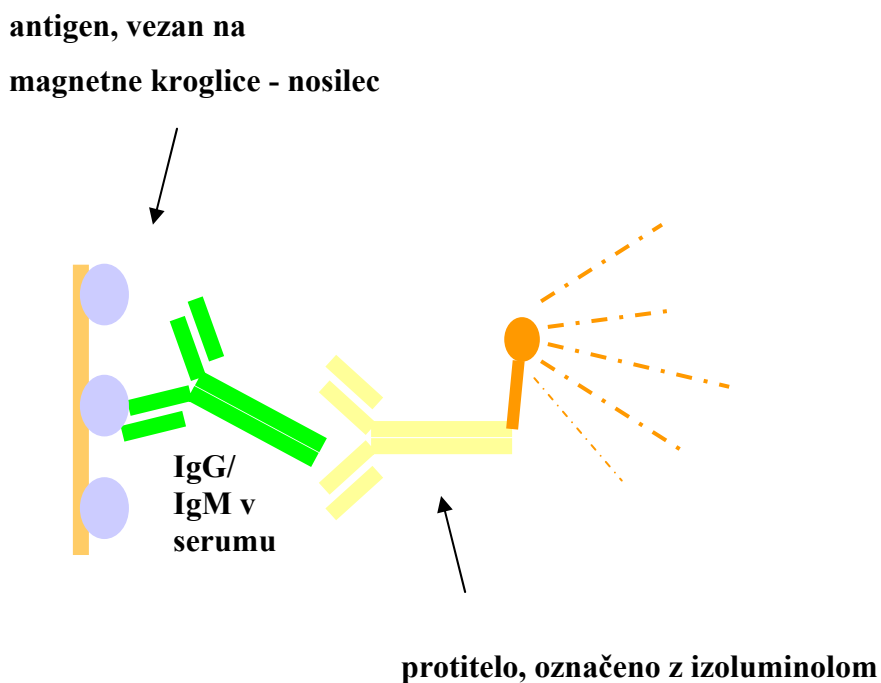
x = odčitana koncentracija protiteles

6.2.2 Kemiluminiscenčni test (CLIA)

6.2.2.1 Princip testa

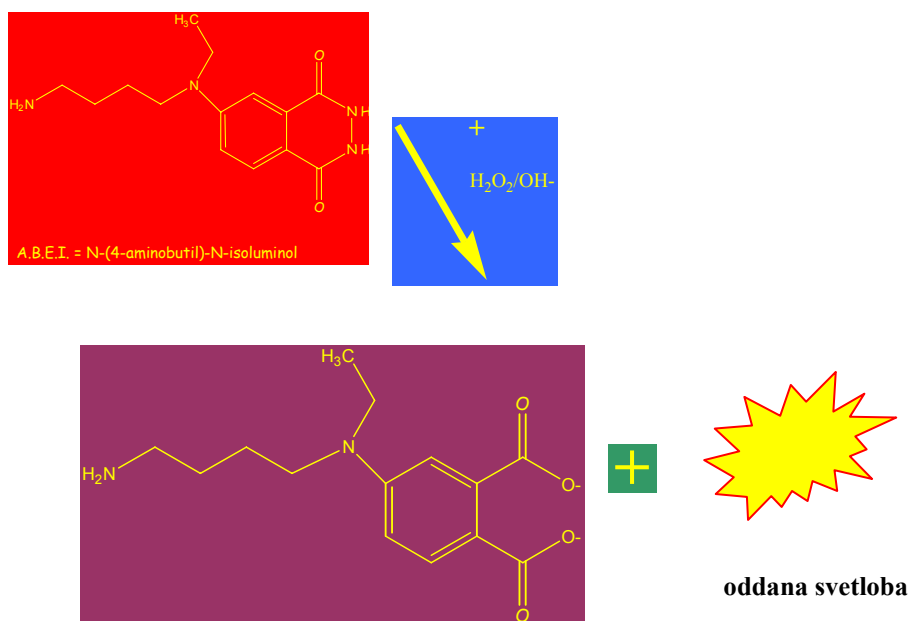
Kemiluminiscenčni test oz. kemiluminiscenčni imunski test (CLIA) uporabljamo za posredno kvantitativno določitev specifičnih protiteles IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA in IgG anti-EA(D) v serumih in likvorju. V osnovi je podoben encimsko imunskemu testu, le da tu uporabljamo kot trdno fazo magnetne kroglice, na katere so vezani sintetični peptid p18 za določitev IgG anti-VCA, p18 za določitev IgM anti-VCA, EBNA-1 za določitev IgG anti-EBNA in rekombinantni polipeptid EA(D) za določitev IgG anti-EA (slika 15). Sintetični peptidi in rekombinantni polipeptid so analogi nativnih virusnih antigenov. Protitelesa, ki jih določamo, se vežejo na antigene, njihovo vezavo pa

dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, na katera je konjugiran izoluminolni derivat.



Slika 15: Princip kemiluminiscenčnega testa CLIA (DiaSorin-Navodila za aparaturo LIAISON, 2002)

Če pride do vezave konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju posebnega reagenta sprosti svetlobni signal (slika 16), ki ga aparatura izmeri kot relativne luminiscenčne enote (RLU; angl.: relative luminescence units) in te enote kažejo na koncentracijo protiteles v vzorcu, kalibratorju ali kontroli.



Slika 16: Kemiluminiscenčna reakcija (DiaSorin-Navodila za aparaturu LIAISON, 2002)

6.2.2.2 Postopek testa

Vsi integrali z reagenti so označeni s črtnimi kodami, ki jih aparat prepozna in mu omogočajo prepoznavanje vsebine. V kolikor se čitalec pokvari, je možno kodo vnesti ročno.

Postopek testa v aparaturi:

- redčenje vzorcev in kontrol s pufrom A (za določitev IgM anti-VCA)
- vstavljanje kalibratorjev, kontrol ali vzorcev
- dodajanje magnetnih delčkov, obdanih z antigeni
- 10-minutna inkubacija (protitelesa iz vzorca ali kontrole se vežejo na trdno fazo)
- spiranje z izpiralnim pufrom
- dodajanje konjugata
- 10-minutna inkubacija (konjugat reagira s protitelesi, vezanimi na trdno fazo)
- spiranje z izpiralnim pufrom
- merjenje oddane svetlobe

Aparatura omogoča istočasno izvedbo 15 različnih testov za dokaz protiteles proti drugim mikroorganizmom v zelo kratkem času. Naenkrat lahko testira 120 vzorcev, ki so vstavljeni v 12 nosilcev z 10 odprtini. V času ene ure lahko izvede do 180 meritev (skupaj 720 v šestih urah, povprečni čas enega testa je 17 minut).

Aparatura sama ohlaja reagente, javlja njihovo količino oz. koliko testov lahko z integralnim reagentom še izvede, vključuje avtomatsko kalibracijo dnevno in na 2-6 tednov, odčitava kode vstavljenih vzorcev in vseh potrebnih reagentov, redči vzorce in reagente ter vzdržuje temperaturo celotnega sistema.

3.2.2.3 Način podajanja rezultatov

Aparatura LIAISON izmeri svetlobni signal, ki ga odda nastali izoluminolni-protitelesni konjugat v relativnih luminiscenčnih enotah (RLU; angl.: relative luminescence units), ki je sorazmeren s koncentracijo protiteles (x) v vzorcih, kontrolah in kalibratorjih. Rezultate koncentracij poda v enotah/ml (preglednica 7).

Pri meritvah koncentracij vseh 4 protiteles so podane tudi meje, znotraj katerih so meritve uspešne: za IgM anti-VCA 0-160 U/ml, za IgG anti-VCA 0-750 U/ml, za IgG anti-EBNA 0-600 U/ml in za IgG anti-EA(D) 0-150 U/ml. V kolikor so izmerjene vrednosti nad določenimi mejami, lahko napake iščemo v preveč razredčenem vzorcu.

Preglednica 7: Mejne vrednosti kemiluminiscenčnega testa CLIA (Dia Sorin-Navodila za aparaturo LIAISON, 2002)

Vrsta protiteles	Negativen rezultat- (neg.) (U/ml)	Mejni rezultat- (eqv.) (U/ml)	Pozitiven rezultat- (poz.) (U/ml)
IgM anti-VCA	$x < 20$	20 - 40	$x \geq 40$
IgG anti-VCA	$x < 20$	/	$x \geq 20$
IgG anti-EBNA	$x < 5$	5 - 20	$x \geq 20$
IgG anti-EA	$x < 10$	10 - 40	$x \geq 40$

x = odčitana koncentracija protiteles

6.2.2.4 Vrednotenje rezultatov metod ELISA in CLIA

Pri obeh metodah smo komentarje označili z izrazi: ni okužbe (No), akutna zgodnja okužba (Az), akutna okužba (A), akutna pozna okužba (Ap), konvalescenca (K), nedavna okužba (Ne), pretekla okužba (P), sekundarna EBNA-negativnost (S), reaktivacija (R), kronična okužba (kr.ok.) in nelogičen rezultat (ne-log.) ter ovrednotili njihov pomen (preglednica 8).

Preglednica 8 : Rezultati pri različnih stopnjah okužbe (Okano in sod., 1988; DiaSorin-Navodila za aparaturo ETI-STAR TM, 2000; Dia Sorin-Navodila za aparaturo LIAISON, 2002)

Stopnja okužbe	Vrsta protitelesa			
	IgM anti-VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EBNA	IgG anti-EA
Ni okužbe	-	-	-	-
Akutna zgodnja	+	-	-	+
Akutna okužba	+	+	-	+/-
Akutna pozna	-	+	-	+/-
Konvalescenca	+	+	+	-
	+/-	+	+/-	+/-
Nedavna okužba	-	+	-	+/-
Pretekla okužba	-	+	+	-
Sekundarna EBNA-negativnost	+	+	-	-
Reaktivacija	+/-	+	+	+
Kronična okužba	+	+	-(+)	+

3.3 VREDNOTEJE METOD

3.3.1 Diagnostična občutljivost

Diagnostično občutljivost (Se; angl.: sensitivity) izrazimo z razmerjem oseb z določeno boleznijo, pri katerih je rezultat testa resnično pozitiven (RP). Negativni rezultat testa pri okuženih pomeni lažno negativen rezultat (LN). Občutljivost podamo z odstotki (%), redko z relativno vrednostjo (0-1); (Gordis, 2004).

Diagnostično občutljivost izračunamo po formuli:

$$\text{Se (občutljivost)} = \frac{RP}{RP + LN} \quad (\%) \quad \dots(1)$$

Čim manjša je občutljivost, manjšo sposobnost zaznave bolezni ima test. Če je relativna vrednost občutljivosti 1 oz. v odstotkih 100 % pomeni, da je test stototno sposoben zaznati bolezen.

7 REZULATI

V raziskavo smo vključili 100 vzorcev (99 serumov in 1 likvor) bolnikov s sumom na okužbo z VEB, katerih klinične slike smo poznali le pri 22. V 6 primerih je bila diagnoza IM, v 3 KNŽ in v 3 kronična utrujenost, v 2 stanje po virozi, v preostalih pa po 1 primer pljučnice, aplastične anemije, hemoragični enterokolitis, akutna mieloblastična levkemija, limfadenopatija, neopredeljeni hepatitis, stanje po presaditvi organa in slabost.

Vzorci smo pretestirali z dvema metodama: encimsko imunsko metodo ELISA in kemiluminiscenčno metodo CLIA, ter dobljene rezultate med seboj primerjali.

V serumih in likvorju smo ugotavljali imunski odziv na okužbo z VEB in za vsakega posameznika opredelili stopnjo okužbe.

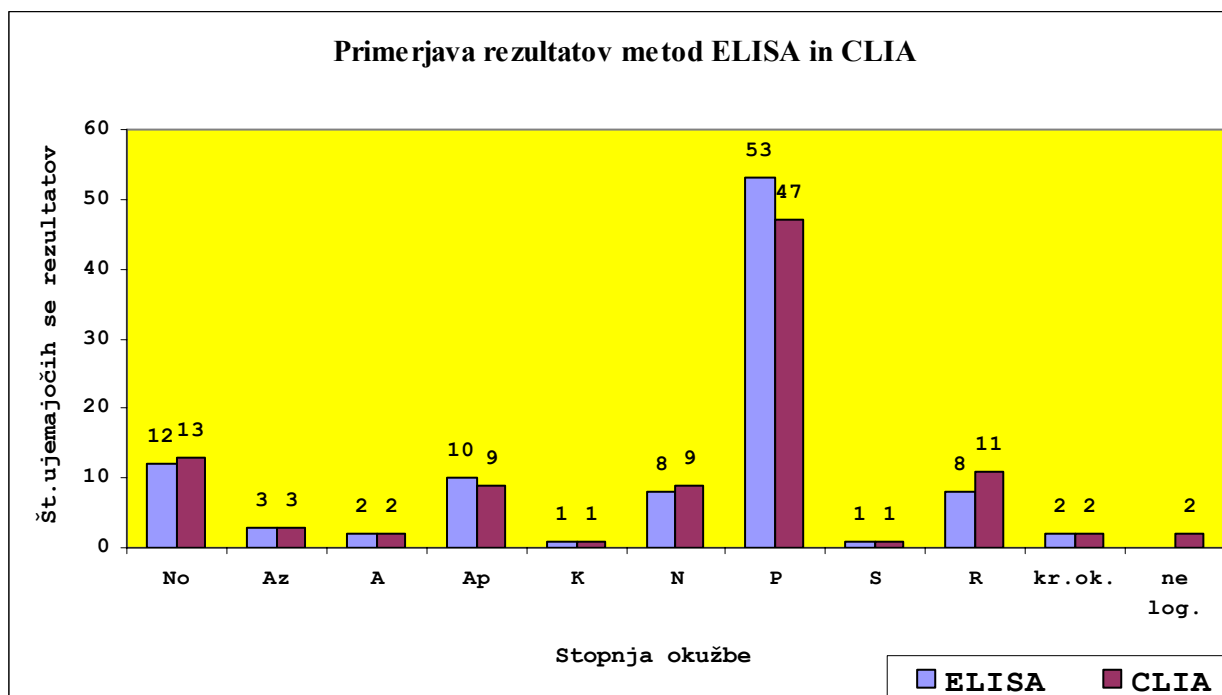
7.1 PRIMERJAVA REZULTATOV METOD ELISA IN CLIA

Po primerjavi rezultatov obeh metod smo ugotovili, da se od 100 testiranih vzorcev 9 rezultatov (opredeljenih stopenj okužb) pri obeh metodah ne ujema (preglednica 9 in slika 17). Največje ujemanje (100 %) smo ugotovili pri akutni začetni okužbi, akutni okužbi, konvalescenci, sekundarni EBNA-negativnosti in kronični okužbi. Rezultati se niso ujemali pri reaktivaciji, pri pretekli okužbi, nedavni okužbi, akutni pozni okužbi in pri bolnikih, ki stika z virusom še niso imeli.

Preglednica 9: Število rezultatov (opredeljenih stopenj okužb) metod ELISA in CLIA

Stopnja okužbe /metoda	No	Az	A	Ap	K	N	P	S	R	kr.ok.	ne-log.
ELISA	12	3	2	10	1	8	53	1	8	2	/
CLIA	13	3	2	9	1	9	47	1	11	2	2
Delež ujemanja ELISA in CLIA (%)	92,3	100	100	90	100	88,9	88,6	100	72,7	100	/

No=ni okužbe, Az=akutna zgodnja okužba, A=akutna okužba, Ap=akutna pozna okužba, K=konvalescenca, N=nedavna okužba, P=pretekla okužba, S=sekundarna EBNA negativnost, R=reaktivacija, kr.ok.=kronična okužba, ne-log.=nelogičen rezultat



No=ni okužbe, Az=akutna zgodnja okužba, A=akutna okužba, Ap=akutna pozna okužba, K=konvalescenca, N=nedavna okužba, P=pretekla okužba, S=sekundarna EBNA negativnost, R=reaktivacija, kr.ok.=kronična okužba, ne-log.=nelogičen rezultat

Slika 17: Grafičen prikaz primerjave rezultatov metod ELISA in CLIA

7.2 ANALIZA VZORCEV, KATERIH REZULTATI SE NISO UJEMALI

Devet vzorcev, katerih rezultati obeh metod se niso ujemali, smo analizirali pri kateri vrsti protiteles je prišlo do odstopanj, oz. katera aparatura jih je zaznala in v kolikšni količini (preglednica 10).

V primeru vzorcev z oznakami 29, 54, 61 in 89 (preglednica 10) smo z metodo ELISA določili preteklo okužbo. Koncentracija protiteles IgG anti-EA je bila zelo nizka, z metodo CLIA pa smo ta protitelesa določili v visokih koncentracijah. Rezultate dobljene z metodo CLIA smo opredelili kot reaktivacijo virusa. Klinična slika je bila znana le pri vzorcu z oznako 89-splošna slabost.

Pri vzorcu z oznako 63 (preglednica 10) je rezultat obraten kot pri prejšnjih štirih vzorcih; reaktivacijo smo določili z metodo ELISA in preteklo okužbo z metodo CLIA.

Pri vzorcu z oznako 142 (preglednica 10) smo z metodo ELISA opredelili preteklo okužbo, pri metodi CLIA pa smo dobili nelogičen rezultat. Pri obeh metodah sta bili koncentraciji protiteles IgG anti-VCA in IgG anti-EBNA zelo visoki, koncentracija protiteles IgG anti-EA pa je bila nizka, ni pa logično, da smo hkrati izmerili visoko koncentracijo protiteles IgM anti-VCA.

Podobno nelogičen rezultat pri CLIA metodi smo dobili pri vzorcu z oznako 69 (preglednica 10); stopnjo okužbe z metodo ELISA smo opredelili kot preteklo. Glede na visoko koncentracijo protiteles IgG anti-EBNA pri metodi CLIA, bi bilo smiselno, da so v višji koncentraciji tudi protitelesa IgG anti-VCA, vendar jih aparatura LIAISON ni zaznala.

Pri vzorcu z oznako 74 (preglednica 10) je bila stopnja okužbe z metodo ELISA opredeljena kot pretekla, pri metodi CLIA pa smo opredelili nedavno okužbo. Aparatura ETI-STAR je izmerila visoko koncentracijo protiteles IgG anti-EBNA, aparatura LIAISON pa nizko.

Pri vzorcu z oznako 85 (preglednica 10) je bila stopnja okužbe z metodo ELISA opredeljena kot akutna pozna, pri metodi CLIA pa kot, da ni bilo okužbe. Aparatura ETI-STAR je izmerila le koncentracijo protiteles IgG anti-VCA, aparatura LIAISON pa koncentracije vseh štirih vrst protiteles, le da so te bile zelo nizke.

Preglednica 10: Prikaz 9 vzorcev, ki se niso ujemali v stopnji okužbe in v koncentraciji protiteles

Zap.št. vzorca	ELISA (AU/ml)					CLIA (U/ml)				
	IgM anti- VCA	IgG anti- VCA	IgG anti- EBNA	IgG anti- EA	Rezultat	IgM anti- VCA	IgG anti- VCA	IgG anti- EBNA	IgG anti- EA	Rezultat
29	0	217	203	0	P	<<10	719	>>600	53,3	R
54	0	65	70	28	P	<<10	112	285	97,1	R
61	0	235	306	32	P	<<10	432	>>600	62,8	R
63	43	68	114	0	R	10,3	26,9	317	<<5	P
69	0	46	99	0	P	<<10	<<10	108	<<5	ne-log.
74	0	51	34	0	P	<<10	32,6	4	<<5	N
85	0	24	0	0	Ap	<<10	<<10	<<3	<<5	No
89	0	71	36	0	P	<<10	85,1	73,4	35,3	R
142	0	202	277	0	P	77,7	610	>>600	<<5	ne-log.

No=ni okužbe, Ap=akutna pozna okužba, N=nedavna okužba, P=pretekla okužba, R=reaktivacija, ne-log.=nelogičen rezultat

4.3 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST (Se)

Rezultate vsake metode smo razvrstili posebej v 3 skupine: pozitivni rezultati, mejni rezultati in negativni rezultati (preglednica 11 in preglednica 12) .

Diagnostično občutljivost (preglednica 13 in preglednica 14) smo izračunali za vsako metodo in za vsako vrsto protiteles posebej po formuli (1) tako, da smo kot resnično pozitivne vzeli skupaj pozitivne in mejne rezultate, za lažno negativne pa negativne rezultate.

Preglednica 11: Rezultati metode ELISA (delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov)

Vrsta protiteles	Pozitivni rezultati (št. ali %)	Mejni rezultati (%)	Negativni rezultati (št. ali %)
IgM anti-VCA	14	7	79
IgG anti-VCA	83	/	17
IgG anti-EBNA	62	/	38
IgG anti-EA	27	2	71

Preglednica 12: Rezultati metode CLIA (delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov)

Vrsta protiteles	Pozitivni rezultati (št. ali %)	Mejni rezultati (%)	Negativni rezultati (št. ali %)
IgM anti-VCA	11	4	85
IgG anti-VCA	82	/	18
IgG anti-EBNA	68	6	26
IgG anti-EA	22	12	66

Preglednica 13: Diagnostična občutljivost metode ELISA

Vrsta protiteles	Diagnostična občutljivost (%)	Relativna vrednost občutljivosti (0-1)
IgM anti-VCA	21 %	0,21
IgG anti-VCA	83 %	0,83
IgG anti-EBNA	62 %	0,62
IgG anti-EA	29 %	0,29

Preglednica 14: Diagnostična občutljivost metode CLIA

Vrsta protiteles	Diagnostična občutljivost (%)	Relativna vrednost občutljivosti (0-1)
IgM anti-VCA	15 %	0,15
IgG anti-VCA	82 %	0,82
IgG anti-EBNA	74 %	0,74
IgG anti-EA	34 %	0,34

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V 100 vzorcih (99 serumov in 1 likvor) bolnikov s sumom na okužbo z VEB smo ugotavljali imunski odziv. Primerjali smo dve metodi: ELISA in CLIA, s katerima smo določali protitelesa IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA, IgG anti-EA in njihove koncentracije ter opredelili stopnjo virusne okužbe. Zanimalo nas je, ali s še ne preizkušeno metodo CLIA dobimo enake rezultate kot z že vpeljano metodo ELISA in katera metoda ima večjo diagnostično vrednost.

Rezultati obeh metod so se v 91 % ujemali, kar pomeni, da je bilo z dobljenimi rezultati obeh metod 91 stopenj okužb enako določenih, 9 pa se jih ni ujemalo kljub ponovitvam. Pri dveh vzorcih z oznakama 69 in 142 smo z metodo CLIA dobili izmerjene vrednosti, s katerimi nismo mogli opredeliti stopnjo okužbe in aparatura nam je podala rezultata kot nelogična (preglednica 10). V preostalih sedmih primerih (oznake 29, 54, 61, 63, 74, 85 in 89) je prišlo do neskladnih rezultatov v stopnjah okužbe zaradi drugače izmerjenih vrednosti koncentracij posameznih vrst protiteles (preglednica 10). Rezultati so se razlikovali v koncentraciji ene vrste protiteles, vendar je to vplivalo na končno opredelitev stopnje okužbe.

V šestih primerih (preglednica 10) so se rezultati obeh metod razlikovali toliko, da je bila interpretacija rezultatov različna (npr.: pri vzorcih 29, 54, 61 in 89 smo z metodo CLIA določili reaktivacijo virusa, z metodo ELISA pa okužbo v preteklosti, pri vzorcu 63 smo z metodo CLIA določili okužbo v preteklosti, z metodo ELISA pa reaktivacijo virusa in pri vzorcu 74 smo z metodo ELISA določili nedavno okužbo, z metodo CLIA pa okužbo v preteklosti).

Pri vzorcu 85 z metodo CLIA nismo določili protiteles, z metodo ELISA pa akutno pozno okužbo. Takšno neskladje smo dobili pri bolnici s Pediatrične klinike po presaditvi organa,

kjer zaradi zdravljenja z imunosupresivnimi zdravili ni prišlo do značilnega imunskega odgovora.

Izračunane diagnostične občutljivosti obeh metod so si glede vseh štirih vrst protiteles precej podobne. Diagnostična občutljivost za protitelesa IgM anti-VCA pri metodi ELISA je 21 %, pri metodi CLIA 15 %; za protitelesa IgG anti-VCA pri metodi ELISA 83 %, pri metodi CLIA 82 %; za protitelesa IgG anti-EBNA pri metodi ELISA 62 %, pri metodi CLIA 74 % in za protitelesa IgG anti-EA pri metodi ELISA 29 %, pri metodi CLIA pa 34 %. Podobne vrednosti kažejo, da lahko tudi metodo CLIA uporabimo v diagnostiki okužb z VEB. Dobljena diagnostična občutljivost je sorazmerno nizka, vendar kombinacija štirih rezultatov da dobro informacijo o stopnji okužbe z VEB.

5.2 SKLEPI

- Večina okužb z VEB temelji na prepoznavnih kliničnih znakih, kljub temu pa je potrebna tudi laboratorijska diagnostika.
- Pri neskladnih rezultatih bi bilo potrebno preveriti rezultate še z eno metodo, npr. z odtisom Western.
- Rezultati kažejo, da metodo CLIA lahko uporabimo v diagnostične namene.
- Prednost uporabe metode CLIA oz. aparature LIAISON so:
 - hkrati izvajamo do 15 različnih testov (poleg protiteles proti VEB lahko določimo še protitelesa proti številnim drugim mikroorganizmom)
 - hkrati lahko pregledujemo do 120 vzorcev in med izvajanjem testov lahko začnemo z drugimi testi (maksimalni čas največjega števila testov je 6 ur)
 - povprečni čas za izvedbo enega testa je 35-45 minut
 - vsi reagenti so komercialno pripravljeni in ni potrebno dodatno redčenje oz. pripravljanje
 - v kolikor reagentov ne porabimo v celoti, jih shranimo pri ustreznih pogojih in uporabimo v nadaljnjih 8 tednih

6 POVZETEK

Virus Epstein-Barr ali človeški herpesvirus 4, spada v družino herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružino gamaherpesvirusov (*Gammaherpesvirinae*) in v rod limfokriptovirus (*Lymphocryptovirus*). Razširjen je povsod po svetu in z njim pridemo v stik pogosto že zgodaj v otroštvu. Z njim je v razvitih državah okužene 80-90 % odrasle populacije, v državah v razvoju pa naj bi do okužb z virusom prišlo že pri otrocih do drugega leta starosti. Virus se najpogosteje prenaša s slino, nedavno pa je bil odkrit tudi v mleku 46 % doječih mater, kar predstavlja do sedaj manj znano pot širjenja.

VEB je povzročitelj infekcijske mononukleoze, sodeluje pri nastanku karcinoma nosno-žrelnega prostora, Burkittovega limfoma in drugih limfoproliferativnih motnjah pri imunsko oslabljenih osebah. Povezujejo ga tudi z limfoproliferativno boleznijo po presaditvi organov, s Hodgkinovo boleznijo, ne-Hodgkinovo boleznijo pri bolnikih z AIDS-om in gladko-mišičnimi tumorji pri otrocih z imunsko pomanjkljivostjo.

Gostitelj na okužbo z VEB odgovori z različnimi protitelesi, ki so specifična za različne vrste virusnih antigenov. Po primarni okužbi se najprej pojavijo protitelesa proti zgodnjemu antigenu in virusnemu kapsidnemu antigenu, nekaj tednov po okužbi pa še protitelesa proti jedrnemu antigenu, ki tudi uravnavajo latenco VEB. Med reaktivacijo virusa so navzoča protitelesa proti zgodnjemu antigenu in virusnemu kapsidnemu antigenu, v latentnem stanju protitelesa proti zgodnjemu antigenu izginejo. Protitelesa proti virusnemu kapsidnemu antigenu in jedrnemu antigenu se ohranijo skozi vse življenje. S sledenjem štirih vrst specifičnih protiteles smo določili naslednje stopnje okužb: akutna zgodnja, akutna, akutna pozna, konvalescenca, nedavna okužba, pretekla okužba, sekundarna EBNA-negativnost in reaktivacija virusa.

Namen naše naloge je bil, da ugotovimo serološki odziv bolnikov s sumom na okužbo z VEB, z encimsko imunsko metodo, ki jo uporabljajo za vsakodnevno diagnostično dejavnost, in s še ne preizkušeno kemiluminiscenčno metodo. Rezultate dobljene z obema

metodama smo primerjali, ugotovili specifičnost in ovrednotili, katera metoda ima večjo diagnostično vrednost.

Za izvedbo encimsko imunskega testa smo uporabili aparaturu ETI STAR TM, proizvajalca DiaSorin, za izvedbo kemiluminiscenčnega testa pa aparaturu LIAISON istega proizvajalca.

Kemiluminiscenčni test je v osnovi podoben encimsko imunskemu testu, le da tu uporabimo kot trdno fazo sintetični peptid, na katerega so vezane magnetne kroglice; polipeptid je analog nativnim virusnim antigenom. Protitelesa, ki jih določamo, se vežejo na antigen; vezavo dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, na katera je konjugiran izoluminolni derivat. Če pride do vezave izoluminolnega-protitelesnega konjugata na prvi kompleks, se po dodajanju posebnega reagenta sprosti svetlobni signal, ki ga aparatura izmeri kot relativne luminiscenčne enote.

V raziskavo smo vključili 100 arhivskih vzorcev (99 serumov in 1 likvor) bolnikov s sumom na okužbo z VEB iz strokovne dejavnosti Laboratorija za diagnostiko herpesvirusov in respiratornih virusov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

V šestih primerih so se rezultati obeh metod razlikovali toliko, da je bila interpretacija rezultatov različna (npr.: pri vzorcih 29, 54, 61 in 89 smo z metodo CLIA določili reaktivacijo virusa, z metodo ELISA pa okužbo v preteklosti, pri vzorcu 63 smo z metodo CLIA določili okužbo v preteklosti, z metodo ELISA pa reaktivacijo virusa in pri vzorcu 74 smo z metodo ELISA določili nedavno okužbo, z metodo CLIA pa okužbo v preteklosti. Pri vzorcu 85 z metodo CLIA nismo določili protiteles, z metodo ELISA pa akutno pozno okužbo. Takšno neskladje smo dobili pri bolnici s Pediatrične klinike po presaditvi organa, kjer zaradi zdravljenja z imunosupresivnimi zdravili ni prišlo do značilnega imunskega odgovora. Pri dveh vzorcih z oznakama 69 in 142 smo z metodo CLIA dobili izmerjene vrednosti, s katerimi nismo mogli opredeliti stopnjo okužbe in aparatura nam je podala rezultata kot nelogična.

Izračunane diagnostične občutljivosti obeh metod so si glede vseh štirih vrst protiteles precej podobne. Diagnostična občutljivost za protitelesa IgM anti-VCA pri metodi ELISA je 21 %, pri metodi CLIA 15 %; za protitelesa IgG anti-VCA pri metodi ELISA 83 %, pri metodi CLIA 82 %; za protitelesa IgG anti-EBNA pri metodi ELISA 62 %, pri metodi CLIA 74 % in za protitelesa IgG anti-EA pri metodi ELISA 29 %, pri metodi CLIA pa 34 %.

Zaključek vseh rezultatov nam pove, da lahko uporabimo metodo CLIA v diagnostične namene, saj nam aparatura LIAISON nudi določene prednosti pred aparaturo ETI STARTM (metodo ELISA): hkrati izvajamo do 15 različnih testov (poleg protiteles proti VEB lahko določimo še protitelesa proti številnim drugim mikroorganizmom), hkrati lahko pregledujemo do 120 vzorcev in med izvajanjem testov lahko začnemo z drugimi testi (maksimalni čas največjega števila testov je 6 ur), povprečni čas za izvedbo enega testa je 35-45 minut, vsi reagenti so komercialno pripravljeni in ni potrebno dodatno redčenje oz. pripravljanje, v kolikor reagente ne porabimo v celoti, jih shranimo pri ustreznih pogojih in uporabimo v nadaljnjih 8 tednih.

7 VIRI

Ackermann H. 1995. Human herpesvirus. Quebec, Department of Microbiology, Medical Faculty.

http://www.virology.net/Big_Virology/BUDNAherpes.html (11.okt.2005): 1 str.

Burkitt D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. British Journal of Surgery, 46:218-233

Burkitt's lymphoma. 2005. Oko-cho Kohasu, Koshi Medical School

http://www.kochi-ms.jp/~ff_mcrbi/research.html (11.okt.2005): 1.str.

Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2001. Medical microbiology. 22nd ed. New York, R.R.Donnelley&Sons:371-389, 513-515

Crawford D.H. 2004. Epstein-Barr virus. V: Principles and practice of clinical virology. Zuckrman A.J., Banatvala J.E., Pattison J.R., Griffiths P.D., Schaub B.D. (eds). 5th ed. West Sussex, John Wiley&Sons, Ltd.:123-145

De Thé G., Gaser A., Day N.E. 1978. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. Nature, 274:756-761

DiaSorin-ETI-EBV-M (P001605). Instructions. 2000. Saluggia, DiaSorin: 98 str.

DiaSorin-ETI-VCA-G (P001606). Instructions. 2000. Saluggia, DiaSorin: 98 str.

DiaSorin-ETI-EBNA-G (P001607). Instructions. 2000. Saluggia, DiaSorin: 98 str.

DiaSorin-ETI-EA-G (P002093). Instructions. 2000. Saluggia, DiaSorin: 102 str.

DiaSorin-LIAISON-EBV IgM (310500). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin: 5 str.

DiaSorin-LIAISON-VCA IgG (310510). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin: 5 str.

DiaSorin-LIAISON-EBNA IgG (310520). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin: 5 str.

DiaSorin-LIAISON-EA IgG (310540). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin: 5 str.

Epstein M.A., Barr Y.M. 1964. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1:252-253

Epstein M.A., Barr Y.M., Achong B.G. 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet*, 1:702-703

Gärtner B.C., Hess R.D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., Roemer K., Lantzschi-Mueller N. 2003. Evolution of four commercially available Epstein-barr virus Enzyme Immunoassays with an Immunofluorescence Assay as the reference method. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 1:78-82

Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 335 str.

Gu S.Y., Huang T.M., Ruan L., Miao Y.H., Lu H., Chu C.M., Motz M., Wolf H. 1995. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *International Journal of Development Biology*, 84:171-177

Hanle G., Hanle W. 1966. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *Journal of Bacteriology*, 91:1248-1256

Hauser R.A. 2000. Nasopharyngeal carcinoma or poorly differentiated squamous carcinoma. Oak Park, Caring Medical & Rehabilitation Services.

http://www.ipqt.com/cases/nose&throat_cal.htm (20.feb.2006): 1 str.

Infectious mononucleosis. 2001. Milwaukee, Marquette University School of Dentistry-Oral&Maxillofacial Pathology.

<http://www.dental.mu.edu/oralpath/lesion/Infectious/%20mononucleosis/infectiousmononucleosis.htm> (11.okt.2005): 1 str.

Janes S.E.J., Whitehouse W.P. 2003. Branchial neuritis following infection with Epstein-Barr virus. *European Journal of Pediatric Neurology*, 7:413-415

Jarret R.F. 2002. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*, 13:23-29

Junker A.K., Thomas E.E., Redcliff A., Forsyth R.B. 1991. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *American Journal of the Medicine Sciences*, 302, 4:220-223

Khanna R., Sherritt M., Burrows S.R. 1999. EBV structural antigens, gp350 and gp85, as targets for ex vivo virus-specific CTL during acute infectious mononucleosis: potential use of gp350/gp85 CTL epitopes for vaccine design. *Journal of Immunology*, 162:3063-3069

Khanna R., Burrows S.R., Kurilla M.G., Jacob C.A., Misco I.S., Sculley T.B., Kieff E., Moss D.J. 1992. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *Journal of Experimental Medicine*, 176:169-176

Koren S., Avšič-Županc T., Drinovec B., Marin J., Poljak M. 2002. Splošna medicinska virologija. 1.ponatis. Ljubljana, Medicinski Razgledi: 201 str.

Klemenc P., Marin J., Šoba E., Gale N., Koren S in Strojani P. 2006. Distribution of Epstein-Barr virus genotypes in throat washes, sera, peripheral blood lymphocytes and in EBV positive tumor biopsies from Slovenian patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Medical Virology*. (v tisku)

Lam K.M.C., Syed N., Whittle H., Crawford D.H. 1991. Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *Lancet*, 337:876-878

Lee E.S., Locker J., Nalesnik M., Reyes J., Jaffe R., Alashari M., Nour B., Tzakis A., Dickman P.S. 1995. The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *New England Journal of Medicine*, 332:19-25

Levy J.A., Fraenel-Conrat H., Owens R.A. 1994. Viruses with medium and large DNA genome. V: *Virology*. Levy J.A., Fraenel-Conrat H., Owens R.A. (eds.). 3rd ed. New Jersey, Prentice Hall:192-197

Libman H., Barlam T. 2002. Oral hairy leukoplakia. Boston, The Carl J. Shapiro Institute for Education and Research at Harvard Medical School.

<http://www.research.bidmc.harvard.edu/VPTutorials/HIV/Tphot03.htm> (11.okt.2005): 1 str.

Liebowitz D. 1995. Epstein-Barr virus—an old dog with new tricks. *New England Journal of Medicine*, 332, 1:55-57

Liebowitz D. 1998. Epstein-Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *New England Journal of Medicine*, 338, 20:1413-1421

Marin J. 1990. Prispevek k poznavanju vloge virusa Epstein-Barr v Sloveniji. *Zdravniški Vestnik*, 59:405-408

Marin J., Keše D. 1995. Dokazovanje okužb, ki jih povzroča virus Epstein-Barr; encimsko imunski test namesto posredne imunofluorescence. *Zdravniški Vestnik*, 64:13-14

Marin J. 1999. Povezanost med okužbo s herpesvirusi in nastankom neoplazem pri ljudeh. *Zdravniški Vestnik*, 68:309-312

Marin J., Strašek K. 2001. Okužbe z virusom Epstein-Barr—določanje avidnosti protiteles IgG. *Zdravniški Vestnik*, 70:321-323

Marin J. 2003. Virus Epstein-Barr - Encimsko imunski test (ELISA) za dokaz specifičnih protiteles. SOP-P HRP-1. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 5 str.

Marolt-Gomilšek M., Radšel-Medvešček A. 1992. Herpes virusi. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Tangram: 414-421, 471-472

Moss D.J., Elliott S.E., Suhrbier A. 1998. Candidate vaccines for Epstein-Barr virus. British Medical Journal, 317:423-424

Murray P.G., Young L.S. 2001. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potencial for therapy. Cambridge, Centre for Applied Research in Educational Technologies.

<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003842h.htm> (11.okt.2005): 2 str.

Murray P.G, Young L.S. 2001. The Epstein-Barr virus (EBV) genome. Cambridge, Centre for Applied Research in Educational Technologies.

<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003854h.htm> (11.okt.2005): 2 str.

Murray P.G., Young L.S. 2001. The Epstein-Barr virus (EBV) infevton in normal healty virus carriers. Cambridge, Centre for Applied Research in Educational Technologies.

<http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk/01003866h.htm> (11.okt.2005): 2 str.

Niederman J.C., Evans A.S., Subrahmanyam L., McCollum R.W. 1970. Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults. New England Journal of Medicine, 282:361-365

Old L.J., Boyse E.A., Oettgen H.F., Harven E., Geering G., Williamson B., Clifford P. 1966. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 56:1699-1704

Okano M. 1998. Epstein-Barr virus infection and its role in the expanding spectrum of human diseases. *Acta Paediatrica*, 87:11-18

Okano M., Thiele G.M., Davis J.R., Grierson H.L., Purtilo D.T. 1988. Epstein-Barr virus and human diseases: recent advances in diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1, 3:300-312

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 1990. The viruses. V: *Microbiology*. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (eds). Dubuque, Brown Publishers: 272-291, 706

Reschke M. 1997. Representation of human cytomegalovirus. Marburg, Philipps-Universität Marburg.

http://www.biografix.de/english/html/2/h_2b2a.html (11.okt.2005): 1 str.

Rooney C.M., Smith C.A., Ng C.Y.C., Loftin S.K., Sixbey J.W., Gan Y., Srivastava D.K., Bowman L.C., Krance R.A., Brenner M.K., Heslop H.E. 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, 92:1549-1555

Schaade L., Kleines M., Hausler M. 2001. Application of virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibody detection with a polyantigenic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Epstein-Barr virus infection in childhood. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 11:3902-3905

Stannard L. 1995. Human herpesvirus. Cape Town, Department of Medical Microbiology, University of Cape Town.

http://www.virology.net/Big_Virology/BUDNAherpes.html (11.okt.2005): 1 str.

Straus E.S., Cohen J.I., Tosato G., Meier J. 1993. Epstein-Barr virus infection: biology, pathogenesis and management. *Annals of Internal Medicine*, 118:45-58

Weiss L.M., Strickber J.G., Warnke R.A., Purtilo D.T., Sklar J. 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology*, 129:86-91

Weiss L.M., Movahed L.A., Warnke R.A., Sklar J. 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine*, 320:502-506

White O.D., Fenner F.J. 1994. Herpesviridae. V: *Medical virology*. 4th ed. White O.D., Fenner F.J. (eds). San Diego, Academic Press, 321:320-323

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem mentorici prof. dr. Jožici Marin, ki je sprejela mentorstvo, si vzela čas za mene in mi s svojimi nasveti pomagala pri izvedbi diplomske naloge. Hvala tudi za pomoč in vse prijazne besede ostalim zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko infekcij s herpesvirusi in respiratornimi virusi.

Najlepša hvala recenzentki doc. dr. Evi Ružić-Sabljić za koristne nasvete pri pisanju in oblikovanju diplome.

Iskrena hvala sošolki in prijateljici Tjaši Danevčič, za vso njeno požrtvovalno pomoč in dobro voljo med skupnim študijem in pri pisanju diplome ter za krajšanje prostega časa v Ljubljani.

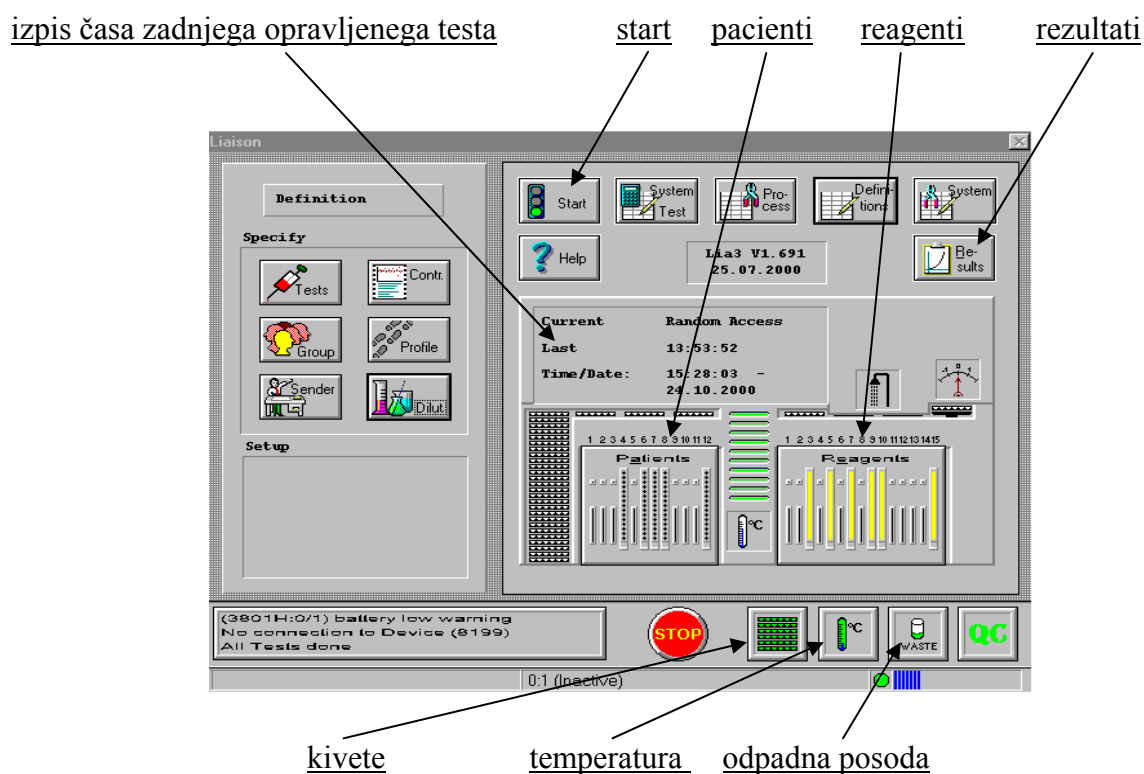
Hvala tudi sošolkama Ani Saksida in Mojci Podgorelec za njuno pomoč in iskreno prijateljstvo ter prijetne ure druženja med študijem.

Hvala fantu Tomažu, da me je med študijem potrpežljivo prenašal in mi ves čas stal ob strani.

Posebna hvala pa gre moji mami, ki me je vsestransko podpirala in spodbujala med obema študijema.

PRILOGA A: NAVODILA ZA UPORABO LIAISONA

Osnovno okno:



I. NA OSNOVNEM OKNU PREKONTROLIRAJ, ČE IMAŠ :

1. dovolj kivet (pritisni na okence desno spodaj - kivete)
 - poglej ali so vsa 4 okenca obarvana zeleno - v kolikor kaj manjka, so obarvana rumeno
 - poglej, koliko kivet je še na razpolago (Reactionmodule) - vrstice morajo biti obarvane zeleno; če kivet ni, jih dodaj (vse potrdiš z »OK«)
2. ustrezno temperaturo reagentov in zraka (pritisni na okence desno od kivet)
 - temperatura zraka »Air« mora biti pod 30 °C (povprečno okrog 20 °C)
 - temperatura reagentov »Reagent« mora biti okrog 9 °C
3. dovolj prostora v posodi za odpadno tekočino (pritisni na okence desno od temperature na »Waste«)
 - obe okenci morata biti obarvani zeleno - v kolikor sta rumeni, zamenjaj posodo za odpadno tekočino
4. dovolj reagentov (pritisni na »Reagents«)

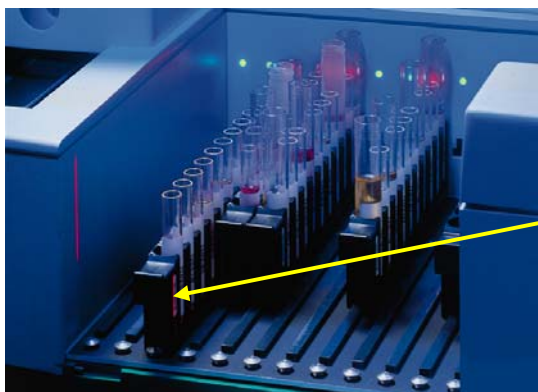
- na posameznem reagentu se ti izpiše število testov, ki jih aparat lahko še izvede, preden mu bo zmanjkalo reagenta - bodi pozoren ali bo dovolj reagenta, sicer vstavi desno od že vstavljenega integrala nov integral z ustreznim reagentom (glej posebna navodila za vstavljanje integralov)

II. VSTAVLJANJE VZORCEV V NOSILCE

1. Vzorci previdno premešaj (2 - 3 krat jih previdno obrni in pazi, da ni mehurčkov).
 2. Delno odvij pokrovčke epruvet z vzorci (jih še ne snemi).
 3. Vstavi jih v nosilec, ki ga imaš trdno postavljenega v stojalu, da se ti vzorci ne prevrnejo in izlijejo (vzorcev ni potrebno potisniti do dna; nosilci so označeni z veliko črko A).
 4. Ko imaš postavljene vse vzorce v nosilec na stojalu, jim odvij pokrovčke do konca in jih odloži na plastičen pladenj, ki ga lahko potem zavržeš.
- * Pomembno je, da si na listu papirja označiš številke vzorcev po vrsti, kakor si jih vstavljal v nosilec (od zadaj - ta bo prvi, proti sebi - ta bo zadnji), ker jih moraš kasneje v pravilnem vrstnem redu vnesti v računalnik.

III. VSTAVLJANJE NOSILCEV V APARATURO LIAISON

1. Nosilce z vzorci (brez pokrovčkov) vstavi enega za drugim v aparat na katerokoli pozicijo (pozoren moraš biti kasneje pri vnašanju številke vzorcev na ustrezna mesta pozicije nosilca).
 2. Odprlo se ti bo že naslednje okno, drugače pa prideš do tega okna tudi tako, da pritisneš na »Patients« na osnovnem oknu.
- * Pri vstavljanju nosilcev bodi pozoren, da ne boš s prsti zakril **črtne kode**, ki se nahaja na desni strani vsakega nosilca. Če si pravilno vstavil nosilec v aparat, se ti na ekranu obarva nosilec na vstavljeni poziciji modro. V kolikor nosilec ni bil pravilno vstavljen ali si s prsti zakril črtno kodo, se ti na ekranu izpiše »Error«, kar pomeni, da vzemi nosilec iz aparata in vse skupaj ponovi še enkrat.



črtna koda

IV. VPIS VZORCEV NA USTREZNE POZICIJE V LIAISONU

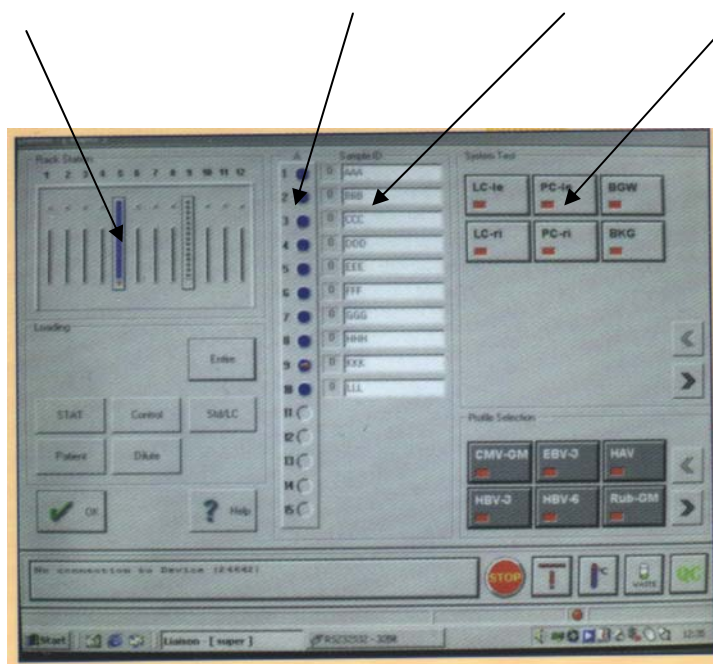
1. Ko imaš vse nosilce z vzorci vstavljene v aparat, zapri pokrov na aparatu.
2. Na ekranu na dotik pritisni na vstavljeni nosilec in ta se ti obarva modro.
3. Desno se ti odprejo okenca v katera vpiši številke vzorcev, po vrsti kot si jih vstavil v nosilec (v pomoč ti je list, ki si ga izpisal prej, ko si vstavljaj vzorce v nosilce).
 - * To lahko narediš najprej za vse vzorce in potem označiš, katere teste hočeš ali pa to narediš sproti.

označen nosilec (moder)

sivo polje

št. vzorcev

posamezni testi



4. Ko si vpisal vse številke vzorcev na ustrezne pozicije v aparatu, pritisni na sivo polje med številkami in modrimi krogi. To polje se ti obarva temneje sivo, kar pomeni, da si označil vseh deset vzorcev v tem nosilcu.
5. Sledi nastavitev testov.

V. NASTAVITEV TESTOV

1. Ko imaš označene vzorce (vsakega posebej ali vseh deset skupaj), pritisni na desni strani na teste, katere želiš, da jih aparat izvede. Z »>>>« ali z »<<<« se pomikaj med različnimi testi. Ko najdeš ustrezen test, pritisni nanj in rdeči kvadrček se bo spremenil v zelenega.
 - * V kolikor želiš izvesti vse štiri teste za VEB (IgM anti-VCA, IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA in IgG anti-EA), jih imaš spodaj združene v skupni ikoni »EBV«, na katero pritisneš. Pri tem se ti prav tako rdeči kvadrček obarva zeleno.

2. Po izbranih testih, pritisni na »**Entire**« kar pomeni, da si označil vse vzorce v nastavku z vsemi testi.
3. Sledi naslednji nosilec, ki ga označiš enako kot si to storil prej, le da namesto »Entire« prej pritisni na »**Edit**«, da se ti odpre okence s testi.
4. Na koncu pritisni levo spodaj »**OK**«. Z »OK« vsak korak potrdiš in zapreš okence.
 - * Najbolje je, da preden zaženeš teste s startom, še enkrat preveriš ali si označil pravilno vse vzorke (njihove pozicije) in če si označil vse teste, ki jih želiš, da jih aparat izvede. To naredi na enak način, kot da bi znova vnašal vzorce.

VI. ZAGON TESTOV

Ko si označil vse teste in na koncu pritisnil »**OK**« te računalnik vrne nazaj na osnovno okno. Tu pritisni levo zgoraj »**Start**« in s tem si vključil izvajanje testov.

VII. REZULTATI

a) Vpogled rezultatov:

1. Na osnovnem oknu pritisni desno na »**Results**« in nato še levo na »**Journal**« (tu pogledaš, če so se res vsi testi začeli s tem, da se zraven vsakega testa izpiše »**active**« in čas, kdaj bo test končan).
 - * Če greš z »OK« iz tega okna nazaj na osnovno okno se ti na sredini izpiše čas, kdaj bodo vsi testi končani; ko so končani, se izpiše »**All tests done**« (levo spodaj v kotu se izpiše čas).
2. Ko je posamezni test končan, se na mestu končnega časa testa izpiše rezultat in še njegov komentar (POS = pozitivno, neg = negativno, eqv G+ = siva cona).

b) Izpis rezultatov:

1. Za izpis rezultatov na list papirja najprej preveri ali imaš vklopljen tiskalnik in ali je v tiskalniku dovolj papirja.
2. Označi vse vzorce z rezultati, ki jih želiš natisniti tako, da pritisneš z miško na ustrezni vzorec in ga označi z **F7** (pred številko vzorca se ti izpiše znak »>>>«, kar pomeni, da si ga označil) potem pa kar nadaljuj po vrsti s pritiskanjem na **F7**.
3. Rezultate še uredi s pritiskom na »**Sort**« desno zgoraj (po vzorcih, po testih, kronološko,...), kar potrdiš spet z »**OK**«.
4. Spodaj pritisni na »**Print**«. Odpre se ti okno, kjer imaš za tiskanje že označeno zadebeljeno črno piko pred »• Tagged« in to samo potrdi s pritiskom na »**OK**«.

c) Izpis rezultatov na disketo:

1. Disketo vstavi v računalnik
2. Vzorce z rezultati označi z **F7** na enak način kot za tiskanje (v kolikor si jih prej že natisnil, so še vedno označeni)
3. Pritisni na »**Print**«, desno spodaj na »**Redirect to file**« in še niže na »**Excel**«.
4. V okence »**File name**« vpiši ime datoteke (najbolje datum ali pa št.vzorca od – do in na koncu končnico **xls**). Potrdi s pritiskom na »**OK**«.