

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nežka KAVČIČ

**DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI  
VIRUSU EPSTEIN BARR PRI BOLNIKI S SUMOM  
NA AKUTNO OKUŽBO S CITOMEGALOVIRUSOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nežka KAVČIČ

**DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EPSTEIN  
BARR PRI BOLNIKI S SUMOM NA AKUTNO OKUŽBO S  
CITOMEGALOVIRUSOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST EPSTEIN  
BARR VIRUS IN PATIENTS WITH SUSPECTED ACUTE INFECTION  
WITH CYTOMEGALOVIRUS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Miroslava Petrovca in za recenzentko prof. dr. Tatjano Avšič Županc.

Mentor: doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miroslav PETROVEC, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitu za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nežka Kavčič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 578.7: 616-097.3(043)=163.6
- KG virusi/virus Epstein Barr/citomegalovirus/sočasna okužba/infekcijska mononukleozna/specifična protitelesa/kemiluminiscenčni test/test imunoblot/reaktivacija virusov
- AV KAVČIČ, Nežka
- SA PETROVEC, Miroslav (mentor) / AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
- IN DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EPSTEIN BARR PRI BOLNIKI S SUMOM NA AKUTNO OKUŽBO S CITOMEGALOVIRUSOM
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 66 str., 14 pregl., 9 sl., 3 pril., 24 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Virus Epstein Barr (EBV) in citomegalovirus (CMV) povzročata pri človeku infekcijsko mononukleozo, ki jo na podlagi kliničnih in laboratorijskih znakov ne moremo ločiti. Za razjasnitev klinične slike so največkrat v uporabi serološki testi za dokazovanje specifičnih protiteles proti obema virusoma. Za pravilno diagnostično opredelitev okužbe z virusom EBV uporabljamo dokazovanje protiteles proti štirim virusnim beljakovinam in za dokaz okužbe z virusom CMV dokaz specifičnih protiteles razreda IgG in IgM ter določanje avidnosti specifičnih protiteles IgG. Ker je večina populacije prekužena z obema virusoma, lahko pri določanju specifičnih protiteles naletimo na težave zaradi navzkrižne reaktivnosti, mogoča pa je tudi sočasna okužba z obema virusoma. V diplomski nalogi smo zato preverili, kakšen je serološki profil specifičnih protiteles proti virusu EBV pri bolnikih z akutno okužbo z virusom CMV. Za dokazovanje specifičnih protiteles smo uporabili metodo kemiluminiscence na aparaturi Liaison, vzorce, v katerih smo dokazali akutno okužbo z virusom CMV in protitelesa EBV IgM, smo nato dodatno testirali z metodo imunoblot. Ugotovili smo, da je pri številnih bolnikih z akutno okužbo z virusom CMV mogoče dokazati reaktivacijo virusa EBV, kar je lahko posledica posledica stimulacije poliklonskih B celic, navzkrižne reaktivacije protiteles ali selektivnega vzbujanja spominskih celic ne glede na virusno replikacijo. Možnost sočasne okužbe z obema virusoma smo ovrgli.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 578.7: 616-097.3(043)=163.6

CX viruses/Epstein Barr virus/cytomegalovirus/coinfection/infectious mononucleosis/specific antibodies/chemiluminescence immunoasay/immunoblot asay/virus reactivation

AU KAVČIČ, Nežka

AA PETROVEC, Miroslav (supervisor) / AVŠIČ ŽUPANC, Tatjana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2010

TI DETERMINATION OF SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST EPSTEIN BARR VIRUS IN PATIENTS WITH SUSPECTED ACUTE INFECTION WITH CYTOMEGALOVIRUS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 66 p., 14 tab., 9 fig., 3 app., 24 ref.

LA sl

AL sl/en

AB EBV and CMV viruses from *Herpesviridae* family cause infectious mononucleosis in human and it is hard to separate between them on base of clinical and laboratory sings. Serological test are often used to detect specific antibodies to clarify the clinical sings. Four viral markers are determined for the diagnosis of EBV infection and specific antibodies IgM and IgG and avidity of specific antibodies IgG are used for evidence of CMV infection. The majority of the population is already infected with both viruses. This may cause problems in detemining specific antibodies because of cross-reactivity and possibility of coinfection with both viruses. The purpose of graduate thesis was determination of specific antibodies against EBV virus in patients with acute infection with CMV. We used chemiluminescence immunoasay to detect acute infection with CMV and EBV IgM antibodies. Then we further tested by immunoblot method. We found out that in many patients with acute CMV infection can be demonstrated reactivation of EBV virus as a result due to polyclonal B cell stimulation, cross-reactivity or excitation of memory cells regardless of viral replication. The possibility of coinfection with both viruses was excluded.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
KAZALO SLIK .....	IX
KAZALO PRILOG .....	X
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 HERPESVIRUSI .....	2
<b>2.1.1 Morfologija herpesvirusov .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Epidemologija herpesvirusov .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Replikacija herpesvirusov .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.4 Citomegalovirus (CMV) .....</b>	<b>4</b>
2.1.4.1 Klinična slika .....	5
2.1.4.2 Določanje okužbe s citomegalovirusom .....	7
2.1.4.2.1 Neposredne metode dokazovanja .....	7
2.1.4.2.2 Posredne metode dokazovanja .....	8
2.1.4.3 Zdravljenje in preventiva .....	9
<b>2.1.5 Virus Epstein Barr (EBV) .....</b>	<b>10</b>
2.1.5.1 Klinična slika .....	11
2.1.5.2 Določanje okužbe z virusom Epstein Barr .....	14
2.1.5.2.1 Neposredne metode dokazovanja .....	14
2.1.5.2.2 Posredne metode dokazovanja .....	15
2.1.5.2 Zdravljenje in preventiva .....	17
<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>18</b>
3.1 VZORCI .....	18
3.2 METODE .....	19
<b>3.2.1 Diagnostični sistem Liaison .....</b>	<b>19</b>
3.2.1.1 Določanje protiteles CMV IgM .....	20

3.2.1.1.1 Princip metode.....	20
3.2.1.1.2 Območje merjenja.....	20
3.2.1.1.3 Vrednotenje rezultatov .....	20
3.2.1.2 Določanje protiteles CMV IgG.....	20
3.2.1.2.1 Princip metode.....	20
3.2.1.2.2 Območje merjenja.....	21
3.2.1.2.3 Vrednotenje rezultatov .....	21
3.2.1.3 Določanje avidnosti protiteles CMV IgG .....	22
3.2.1.3.1 Princip metode.....	22
3.2.1.3.2 Območje merjenja.....	22
3.2.1.3.3 Vrednotenje rezultatov .....	23
3.2.1.4 Določanje protiteles EBV IgM.....	23
3.2.1.4.1 Princip metode.....	23
3.2.1.4.2 Območje merjenja.....	23
3.2.1.4.3 Vrednotenje rezultatov .....	23
3.2.1.5 Določanje protiteles VCA IgG .....	24
3.2.1.5.1 Princip metode.....	24
3.2.1.5.2 Območje merjenja.....	24
3.2.1.5.3 Vrednotenje rezultatov .....	24
3.2.1.6 Določanje protiteles EA IgG .....	25
3.2.1.6.1 Princip metode.....	25
3.2.1.6.2 Območje merjenja.....	25
3.2.1.6.3 Vrednotenje rezultatov .....	25
3.2.1.7 Določanje protiteles EBNA IgG.....	26
3.2.1.7.1 Princip metode.....	26
3.2.1.7.2 Območje merjenja.....	26
3.2.1.7.3 Vrednotenje rezultatov .....	26
<b>3.2.2 recomLine EBV IgG (avidity) (IgA) in recomLine EBV IgM.....</b>	<b>27</b>
3.2.2.1 Princip metode.....	27
3.2.2.2 Potek testa.....	29
3.2.2.3 Vrednotenje rezultatov .....	30
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI CITOMEGALOVIRUSU .....	34
4.2 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EPSTEIN BARR .....	35
4.3 OPREDELITEV REZULTATOV GLEDE NA STATUS OKUŽBE Z VIRUSOM CMV .....	37
4.4 POTRJEVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EBV .....	44
<b>4.4.1 Določanja protiteles razreda IgM proti virusu Epstein Barr z metodo imunoblot.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.2 Določanje protiteles razreda IgG proti virusu Epstein Barr z metodo imunoblot.....</b>	<b>45</b>

<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>48</b>
5.1 RAZPRAVA.....	48
<b>5.1.1 Uvod .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2 Analiza Rezultatov.....</b>	<b>53</b>
5.2 SKLEPI.....	60
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>62</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>63</b>
ZAHVALA.....	67
PRILOGE .....	68



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Predvidena diagnoza glede na prisotnost protiteles proti virusu CMV in avidnost protiteles CMV IgG (Hodinka, 1999).....	<b>9</b>
<b>Preglednica 2:</b> Predvidena diagnoza glede na prisotnost protiteles proti virusu EBV (Aalto in sod., 1998). .....	<b>16</b>
<b>Preglednica 3:</b> Antigeni EBV in njihovi uporabljeni rekombinantni analogi pri testu imunoblot (Mikrogen, 2008). .....	<b>28</b>
<b>Preglednica 4:</b> Intenzivnost reakcijskih pasov v primerjavi z mejnim kontrolnim pasom pri metodi <i>recomLine</i> (Mikrogen, 2008). .....	<b>31</b>
<b>Preglednica 5:</b> Ključni antigeni za ločevanje med različnimi bolezenskimi stopnjami (Mikrogen 2008).....	<b>32</b>
<b>Preglednica 6:</b> Razlaga reaktivnosti med virusnimi antigeni in specifičnimi protitelesi (Mikrogen, 2008).....	<b>33</b>
<b>Preglednica 7:</b> Preglednica izbora vzorcev, ki vsebujejo specifična protitelesa razreda IgM proti citomegalovirusu.....	<b>34</b>
<b>Preglednica 8:</b> Prisotnost protiteles CMV IgG v 108 serumskih vzorcih s protitelesi CMV IgM. ....	<b>34</b>
<b>Preglednica 9:</b> Prikaz rezultatov določanja avidnosti protiteles CMV IgG za 93 vzorcev s prisotnimi protitelesi CMV IgM in CMV IgG. ....	<b>35</b>
<b>Preglednica 10:</b> Prisotnost protiteles EBV IgM pri osebah s prisotnimi protitelesi CMV IgG	<b>37</b>
<b>Preglednica 11:</b> Razmerje med osebami z različno avidnostjo protiteles CMV IgG in prisotnostjo protiteles EBV IgM.....	<b>38</b>
<b>Preglednica 12:</b> Prisotnost protiteles EBNA IgG pri osebah z nizko avidnostjo protiteles CMV IgG in prisotnimi protitelesi EBV IgM in VCA IgG.....	<b>38</b>
<b>Preglednica 13:</b> Prisotnost protiteles razreda IgM proti virusu EBV določenih z metodo imunoblot.....	<b>45</b>
<b>Preglednica 14:</b> Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG proti različnim antigenom virusa EBV določenih z metodo imunoblot. ....	<b>46</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Stolpični prikaz deleža moških in žensk vključenih v raziskavo.....	<b>19</b>
<b>Slika 2:</b> Trak <i>recomLine</i> EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM (Mikrogen, 2008).....	<b>29</b>
<b>Slika 3:</b> Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v izbranih vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgM .....	<b>36</b>
<b>Slika 4:</b> Shematski prikaz ključnih rezultatov testiranja z diagnostičnim sistemom Liaison ...	<b>39</b>
<b>Slika 5:</b> Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgG z nizko avidnostjo.....	<b>40</b>
<b>Slika 6:</b> Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgG s srednjo in visoko avidnostjo. ....	<b>42</b>
<b>Slika 7:</b> Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgG s srednjo in visoko avidnostjo. ....	<b>43</b>
<b>Slika 8:</b> Shematska ponazoritev, kako v EBNA-1 Gly-Ala ponovitve in z glicinom obogateni odseki antigenov CMV spodbudijo nastajanje protiteles IgM med okužbo z virusom CMV ali EBV (Lang in sod., 2001). ....	<b>52</b>
<b>Slika 9:</b> Shematska ponazoritev, kako lahko z določanjem specifičnih protiteles s testom s Paul-Bunnellovim antigenom in določanjem avidnosti ločimo med okužbo z virusom CMV in virusom EBV (Lang in sod., 2001). ....	<b>53</b>

## KAZALO PRILOG

<b>Priloga A:</b> Rezultati določanja specifičnih protiteles proti virusu Epstein Barr in citomegalovirusu pridobljeni z diagnostično metodo Liaison.....	<b>68</b>
<b>Priloga B:</b> Rezultati diagnostičnega sistema <i>recomLine</i> EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM za protitelesa IgG proti virusu EBV.....	<b>72</b>
<b>Priloga C:</b> Rezultati diagnostičnega sistema <i>recomLine</i> EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM za protitelesa IgM proti virusu EBV.....	<b>73</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV

AIDS	Sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
CLIA	Kemiluminiscenčni imunski test
CMV	Citomegalovirus
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
EA	Zgodnji antigen pri EBV
EBNA	Jedrni antigen pri EBV
EBV	Virus Epstein Barr
HSV-1	Virus herpes simplex 1
HSV-2	Virus herpes simplex 2
HHV-6	Virus humani herpes 6
HHV-7	Virus humani herpes 7
HHV-8	Virus humani herpes 8
HIV	Človeški virus imunske pomanjkljivosti
HLA	Humani levkocitni antigen
IEA	Takojšnji zgodnji antigeni pri EBV
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IL-5	Interlevkin 5
IL-6	Interlevkin 6
IL-10	Interlevkin 10
KSHV	Virus Kaposijevega sarkoma oz. HHV-8
LEBG	Trak <i>recom</i> Line EBV IgG (Avidity) (IgA)
LEBM	Trak <i>recom</i> Line EBV IgM
mRNA	Informacijska ribonukleinska kislina
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
pp65	65 kDa velik fosfoprotein
PTLD	Post-transplantacijska limfoproliferativna bolezen
RLU	Relativne svetlobne enote
RNA	Ribonukleinska kislina
UL	Enkratne dolge ponovitve (unique long)
US	Enkratne kratke ponovitve (unique short)
VCA	Kapsidni oz. strukturni antigen pri EBV
$\gamma$ -IFN	Gama interferon

## 1 UVOD

Virus Epstein Barr (EBV) in citomegalovirus (CMV) sta človeška virusa, ki spadata v družino *Herpesviridae*. Pri človeku poleg drugih bolezni povzročata predvsem infekcijsko mononukleozo. Klinična in laboratorijska slika bolezni je glede na povzročitelja skoraj neločljiva. Za razjasnitev vzroka bolezni so v uporabi posredni laboratorijski testi, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa proti virusoma. Pri virusu EBV si v diagnostiki pomagamo z dokazovanjem protiteles vrste IgM in IgG, ki so uperjena proti štirim jedrnim in kapsidnim antigenom. Okužbo z virusom CMV skušamo potrditi z dokazovanjem specifičnih protiteles IgM in IgG. Tako pri virusu EBV kot pri CMV lahko izmerimo avidnost protiteles IgG, kar nam olajša določitev stopnje okužbe (Cohen, 1998; Hodinka, 1999).

V Republiki Sloveniji je prekuženost z obema virusoma razmeroma visoka, saj v odrasli populaciji znaša več kot 65 % - to dodatno prispeva k težavnosti določitve povzročitelja klinične slike (Marin, 1990). Pri seroloških testih lahko posledično pride do navzkrižne reaktivnosti protiteles, kar se lahko odraža v lažno pozitivnih rezultatih. Zaradi same narave okužbe pa je teoretično mogoča celo istočasna akutna okužba z obema virusoma (Aalto in sod., 1998).

### 1.1 NAMEN DELA

Predvidevamo, da je večina odraslih oseb že okužena z virusoma EBV. Pri bolnikih z akutno okužbo s citomegalovirusom zato pričakujemo, da bomo večinoma odkrili tak serološki profil, ki bo potrjeval akutno okužbo z virusom CMV in preteklo okužbo z virusom EBV. V laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb so opazili, da je pri nekaterih pacientih, ki so akutno okužbeni z virusom CMV mogoče dokazati v serumu tudi specifična protitelesa razreda IgM usmerjena proti antigenom virusa EBV, kar je bilo potrjeno tudi v strokovni literaturi (Aalto in sod., 1998).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HERPESVIRUSI

Beseda herpes izhaja iz grške besede herpein, ki pomeni „plaziti se“, saj naj bi se kožne lezije in izpuščaji pri herpesni okužbi širili, kot bi se plazili. Poleg virusa influence in virusov, ki povzročajo prehlad, so ti najbolj razširjeni virusi na svetu. Znanih je 25 različnih herpesvirusov, ki lahko okužijo tako človeka kot živali (Cohen, 1998). Človeške herpesviruse uvrščamo v družino *Herpesviridae* in poddružine  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$ . K  $\alpha$  herpesvirusom uvrščamo virus herpes simplex 1 in 2 (HSV-1 in HSV-2), ki sta iz rodu *Simplexvirus*, in virus varicella zoster (VZV), ki je v rodu *Varicellovirus*. V  $\beta$  poddružini je citomegalovirus (CMV) iz rodu *Cytomegalovirus* in v rod *Roseolovirus* prištevamo virus humani herpes 6 in 7 (HHV-6 in HHV-7). K  $\gamma$  herpesvirusom prištevamo virus Epstein Barr (EBV) in virus humani herpes 8 (HHV-8) oz. znan tudi kot herpesvirus Kaposijevega sarkoma (KSHV) iz roda *Lymphocryptovirus* (Drinovec, 2005).

#### 2.1.1 Morfologija herpesvirusov

Herpesvirusi so veliki in kompleksni virusi. Imajo linearno dvovertično DNA, ki vsebuje zapis za približno 80 genov, npr. encime za sintezo in metabolizem DNA. Velikost genoma se med posameznimi virusi razlikuje, največjega pa ima citomegalovirus. Ima enkratne kratke (US) in enkratne dolge (UL) regije, ki so povezane s ponovitvami. Kot pri večini DNA virusov tudi pri njih poteka replikacija in sestavljanje v jedru gostiteljske celice. Beljakovinska ikozaedrična kapsida je kroglaste ali pleomorfne oblike, sestavljena iz 162 kapsomer in obdana z ovojnico. Brstijo iz notranje jedrne membrane, ki se ob zorenju virusov spremeni, tako da se vanjo vgradijo virusni glikoproteini. Virusna membrana je zelo občutljiva, zato poškodovan virus običajno ni infektiven. Virus je zato občutljiv na sušenje, kisline, detergente in organska topila. Med kapsido in ovojnico je tegument, ki vsebuje virusne beljakovine in encime, ki so nujno potrebni pri iniciaciji replikacije. Med poddružinami herpesvirusov ni skupnih antigenov (Cohen, 1998; Hodinka, 1999; Lennete, 1999).

### **2.1.2 Epidemologija herpesvirusov**

Herpesvirusi lahko okužijo večino populacije, razen HHV-2, ki ga lahko prištevamo k spolno prenosljivim boleznim, in HHV-8, ki povzroča Kaposijev sarkom in multipli mielom pri bolnikih z aidsom. Ne povzročajo epidemij, saj je populacija prekužena. Ko se enkrat okužimo, ostanemo okuženi za vedno - to so trajni virusi. Takšni patogeni vzpostavijo ravnovesje s svojim imunokompetentim gostiteljem in po prestani akutni okužbi običajno ne povzročajo simptomov. Ravnovesje pa se lahko poruši zaradi genetskih, imunskih ali okoljskih dejavnikov in takrat lahko pride do reaktivacije. Herpesvirusi lahko vzpodbudijo razvoj rakavih obolenj, življenje ogrožujočih sprememb pri imunsko oslabljenih osebah in celo smrti (Koren, 2005a).

V eni izmed študij so ugotovili, da je polovica obravnavanih bolnikov prvič prišla v stik z virusom CMV na potovanjih v tujino (Just-Nübling in sod., 2003). V večini neevropskih držav je seroprevalenca virusa CMV pri odraslih veliko višja kot v Evropi. V industrijsko razvitih državah se epidemologija virusa CMV spreminja – vedno manj je okuženih oseb in viša se starostna meja, ko posameznik pride prvič v stik s samim virusom. Posledično je več ljudi, pri katerih se pojavlja tveganje za prvo okužbo pri višji starosti, kar poveča možnost razvoja simptomatske okužbe. To je vzbudilo zaskrbljenost in jih vzpodbudilo k razmišljanju o osveščanju popotnikov o tej okužbi, poleg okužbe z virusom Denga in virusom hepatitisom A.

### **2.1.3 Replikacija herpesvirusov**

Herpesvirusi so pri vstopu v telo epitelotrofni, kasneje pa B-limfotropni. Najprej se virus pritrdi na celično površino (Koren in Marin, 2005). S celično membrano se zlije pri ustreznem pH. Nukleokapsida vstopi v citoplazmo. Tegument pripomore k prenosu do jedrne membrane in nukleokapsida se veže nanjo. DNA se sprosti v jedro. Sledi transkripcija, ki je izredno zapleten proces, saj je genom zelo velik. Sodelujejo tri skupine beljakovin, ki so nujno potrebne za nastanek zrelih virusov:

- $\alpha$  beljakovine so zgodnje beljakovine in so del transkripcijske regulacije. Ne najdemo

jih pri zrelih virionih; soudeležene so tudi pri kontroli sinteze  $\beta$  beljakovin.

- $\beta$  beljakovine so ravno tako zgodnje beljakovine in so vključeni v DNA replikacijo – sem prištevamo DNA polimerazo in transkripcijske faktorje.
- $\gamma$  beljakovine so pozne beljakovine in jih prištevamo med strukturne komponente virusa. Nastanejo po začetku podvajanja DNA (Hodinka, 1999; Lennete, 1999).

DNA herpesvirusov se prevede v RNA s pomočjo celičnega encima od DNA odvisne RNA polimeraze I. Transkripcija je odvisna tako od jedrnih faktorjev celice kot od virusnih beljakovin. Kontrola nastajanja virusne mRNA je odločilna pri usmerjanju nadaljnjega dogajanja:

- litična okužba (nastali bodo novi virusni delci in bo celica propadla) in
- trajna okužba ali latenca (ne pride do replikacije DNA) (Hodinka, 1999; Lennete, 1999).

Virusna DNA polimeraza je zapisana v virusnem genomu. Nekateri herpesvirusi imajo celo zapis za timidinsko kinazo, ki omogoča virusu rast v ne-delečih celicah (npr. živčne celice), čeprav te ne vsebujejo prekurzorjev za sintezo DNA. Brez tega se nevrotropni virusi ne bi mogli širiti. Nukleokapsida se sestavi v jedru in nato prodre skozi jedrno membrano ter zapusti celico z eksocitozo ali pa brsti virus skozi kakšno drugo membrano (plazemska membrana) (Hodinka, 1999; Lennete, 1999; Koren in Marin, 2005).

#### **2.1.4 Citomegalovirus (CMV)**

Citomegalovirus je del  $\beta$  poddružine. Njegova značilnost je, da je specifičen za vrsto, saj ima ozek nabor gostiteljev. Prekuženost je večja v socialno ogroženih slojih in v nerazvitih delih sveta. Prenaša se s slino in ostalimi telesnimi tekočinami, kot so urin, kri, semenska tekočina in vaginalne tekočine, z običajnim stikom pa je prenos virusa skoraj nemogoč. Do prenosa z



matere na otroka lahko pride med nosečnostjo ali z mlekom pri dojenju. S starostjo se delež se oseb s protitelesi proti virusu CMV veča. Inaktiviramo ga lahko s pomočjo fizikalnih ali kemijskih dejavnikov, kot so toplota nad 56°C za 30 minut, nizek pH, lipidna topila, UV žarki in ciklično zamrzovanje in odtajevanje (Just-Nübling in sod., 2003; Hodinka, 1999; CDC, 2010).

Virus CMV ima premer od 120 do 200 nm in največji genom med herpesvirusi. Razmnožuje se lahko samo v človeških celicah. Cikel replikacije je dolg od 72 do 94 ur. Njegovo ime izhaja iz značilnega patogenetskega učinka na celice - to je nastajanje celic velikank oz. sincicijev, ki imajo značilno obarvane inkluzije. Virus okuži limfocite T, makrofage, monocite, nevtrofilce in endotelijske celice, ki ohranjajo latentno okužbo. Obstaja zgolj en serotip (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

#### 2.1.4.1 Klinična slika

Okužba pri odraslih največkrat poteka brez simptomov. Virus najprej okuži zgornja dihala in lokalne limfocite v njih. Kroženje limfocitov razširi virus po celotnem telesu do drugih limfocitov, monocitov v vranici in limfnih vozlih. Na koncu se razširi na različne epiteljske celice, npr. v žlezah slinavkah, ledvičnih tubulih, materničnem vratu itd. Ker se simptomi le redko razvijejo, večina zdravih ljudi pogosto ne ve, da je okužena z virusom CMV. Okužba se pri nekaterih lahko kaže tudi kot infekcijska mononukleoza oz. blago bolezensko stanje, ki vključuje povišano telesno temperaturo, utrujenost in oteženo požiranje. Ker imajo podobne simptome tudi druge bolezni, okužba pogosto ostane nepojasnjena (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

Poseben problem predstavljajo okužbe imunsko oslabljenih bolnikov. Okužbe po presaditvah organov ali tkiv (npr. kostni mozeg, pljuča, ledvica, jetra) lahko vodijo do resnih bolezenskih stanj in zapletov. Pride lahko do zavračanja presajenega tkiva, retinitisa, kolitisa, encefalitisa ali celo smrti. Bolnike zato pred transplantacijo testirajo. Osebam brez protiteles ni priporočljivo presaditi organa ali tkiva oseb z okužbo z virusom CMV. Podobne težave se

pojavnjajo tudi pri osebah, ki so imunsko oslABLJENE zaradi drugih razlogov, kot so na primer osebe okužene z virusom HIV, limfoproliferativnimi boleznimi ali rakavimi obolenji. Pri njih se pojavljajo številni simptomi zaradi diseminirane ali visceralne okužbe. Najpogostejši so splenomegalija, pljučnica, hemolitična anemija, miokarditis in encefalitis, ki so lahko smrtne (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

Posebej nevarne so kongenitalne okužbe, do katerih najbolj pogosto pride, če pride ženska med nosečnostjo prvič v stik z virusom CMV. Najpogosteje do tega pride med spolnim odnosom s partnerjem in z urinom ter slino majhnih otrok, ki so okuženi. V nekaterih redkih primerih so lahko občutne posledice tudi, ko pride do reaktivacije virusa. Trenutno prevladuje mnenje, da je v teh primerih manj možnosti okvar. Vzrok je v tem, da ima mati že protitelesa, ki vsaj delno omejujejo okužbo. Do prenosa na plod pride preko maternice. Virus kroži s krvjo po materinem telesu in tako doseže plod ter ga okuži. Pri novorojencih je približno 1 % okuženih, kar predstavlja najvišji odstotek med vsemi kongenitalnimi okužbami. Od tega jih 90 % ob rojstvu ne kaže kakršnih koli simptomov oz. jih večina sploh ne razvije kakršnih koli pomanjkljivosti. Posledice so lahko občutne le začasno, nekatere pa ostanejo doživljenjsko. Nekateri otroci imajo lahko nepravilno delovanje ledvic, slinavke, pljuč, lahko imajo zlatenico ob rojstvu ali pa se rodijo s premajhno porodno težo. Med kronične težave prištevamo predvsem izgubo sluha, vida, kalcinacije v možganih, mentalno zaostalost, pomanjkanje koordinacije in nerazvito glavo. Lahko pride celo do smrtnih primerov (odstotek le-teh je razmeroma visok). Včasih se težave ne pokažejo takoj, ampak šele po enem mesecu do enega leta starosti. V kolikor pride do okužbe preko krvi, so posledice lahko pljučnica ali pa hepatitis (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

Postnatalne okužbe so pri otroku bistveno manj nevarne. Ugotovili so, da večina mater, ki so prekužene z virusom CMV, izloča virus v mleko in tako se 30 do 40 % otrok do prvega leta starosti že okuži s CMV. Okužbe so večinoma brez simptomov, vendar otroci dolgo izločajo virus v urinu in slini ter so zato pomemben vir okužbe. Ključnega pomena je preventiva, kar zlasti velja za seronegativne nosečnice. Izvajamo jo s poostreno osebno higieno, predvsem

rok, in izogibanjem nosečnic izločkom majhnih otrok, zlasti seču (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

#### 2.1.4.2 Določanje okužbe s citomegalovirusom

Ker je večina okužb brez simptomov, največkrat ne opravimo kakršnih koli laboratorijskih testov. V primeru izražene bolezenske slike določamo okužbo z virusom CMV posredno ali neposredno. Pri virusni izolaciji kot vzorec uporabimo: urin, slino, nekoagulirano kri (levkocite),... Za neposredno detekcijo, ko določamo prisotnost specifičnih antigenov in virusne nukleinske kisline, so primerni vzorci tkiva, respiratorni izločki, sediment urina, cerebrospinalna tekočina, amnijska tekočina in periferna kri (levkociti); za in situ hibridizacijo in histopatološki pregled pa so najbolj ustrezne zamrznjene rezine tkiva, s formaldehidom fiksirane rezine tkiva in tkivo, ki je shranjeno v parafinu. Za serološke teste lahko uporabimo serum. Kot ustrezno nadomestilo bi lahko uporabili slino, saj se tako izognemo invazivnemu postopku odvzema krvi pri otrocih (Just-Nübling in sod., 2003; Hodinka, 1999).

##### 2.1.4.2.1 Neposredne metode dokazovanja

Med direktne metode prištevamo:

- Histopatološki test: opazujemo citomegalične celice z bazofilnimi vključki, včasih so vidni eozinofilni citoplazmatski vključki. Jedrni vključki naj bi spominjali na sovine oči. Sam test ni zadosten za postavitev diagnoze.
- Imunoflorescenčni test: v tkivu, pridobljenem med biopsijo ali avtopsijo, določamo prisotnost antigenov CMV s pomočjo označenih protiteles.
- Antigenemijski test: je osnovan na imunocitokemični detekciji 65 kDa velikega fosfoproteina (pp65) v jedru perifernih levkocitov. Ta metoda naj bi bila veliko boljša kot »Shell vial«, saj je izredno hitra, specifična in občutljiva metoda, s katero lahko zaznamo virus CMV, še preden se bolezen razvije.
- Elektronska mikroskopija: odlikujejo jo hitrost in možnost uporabe vzorcev, ki so bili nepravilno shranjeni oz. je prišlo do njihove kontaminacije in tako niso več primerni za

izolacijo virusa. Kot slabost pa lahko navedemo visoke stroške, potrebno izkušnost osebja in neobčutljivost metode.

- Hibridizacija: v uporabi sta dot blot za vzorce urina in perifernih levkocitov, in in situ hibridizacija za različna tkiva ter periferne levkocite.
- PCR: določamo količino virusne DNA v plazmi s kvantitativno metodo PCR (Hodinka, 1999; CDC, 2010).

Za detekcijo v celičnih kulturah je primerna »*Shell vial*« metoda, ki jo dopolnimo z imunoflorescenčnim barvanjem. Za to uporabimo fibroblastne celice (Hodinka, 1999).

#### 2.1.4.2.2 Posredne metode dokazovanja

Pri okužbi z virusom CMV imunski odgovor vključuje sintezo specifičnih protiteles IgM, ki se pojavijo nekaj tednov po okužbi, in IgG, ki se pojavijo še nekoliko kasneje. Običajno količina protiteles CMV IgM narašča nekaj tednov in nato postopoma upade. Znani pa so tudi primeri, ko so bila protitelesa IgM zaznavna še več let kasneje (Just-Nubling in sod., 2003; Hodinka, 1999).

Pri sumu na akutno okužbo serološka diagnostika vključuje določanje protiteles IgM in IgG v serumu s pasivno lateksno aglutinacijo, fiksacijo komplemента, ki je zlasti uporabna za določanje povečanega titra protiteles, z metodo ELISA ali pa s pomočjo florescirajočih protiteles, saj diagnoze ne moremo postaviti zgolj na podlagi klinične slike. Če imamo prisotna protitelesa CMV IgM, še vedno težko ločimo med primarno in sekundarno okužbo. Njihva prisotnost lahko nakazuje na akutno okužbo ali pa reaktivacijo, ki spodbudi sintezo protiteles IgM predvsem pri imunsko oslabljenih osebah. Zato je ključnega pomena, da določimo še protitelesa CMV IgG in dodatno določimo avidnost protiteles, s katero olajšamo razlikovanje med primarno okužbo, reaktivacijo, kronično okužbo, vztrajanjem protiteles IgM in poliklonskim odgovorom imunskega sistema (Preglednica 1). Nizka avidnost nakazuje na možnost primarne okužbe oz. da se je oseba okužila manj kot tri mesece pred odvzemom

vzorca. Kljub vsemu pa ne moremo izključiti možnosti pretekle okužbe, saj se lahko pri nekaterih osebah pojavijo prezistentna protitelesa IgG z nizko avidnostjo. Protitelesa s srednjo avidnostjo lahko dokažemo pri osebah s preteklo okužbo, vendar le-ta niso še popolnoma dozorela. Lahko pa so prisotna tudi pri akutni okužbi. Visoka avidnost popolnoma izniči možnost akutne okužbe oz. je do nje prišlo več kot tri mesece nazaj (Just-Nübling in sod., 2003; Hodinka, 1999).

Preglednica 1: Predvidena diagnoza glede na prisotnost protiteles proti virusu CMV in avidnost protiteles CMV IgG (Hodinka, 1999).

Diagnoza	CMV IgM	CMV IgG	Avidnost
Ni okužbe	Neg.	Neg.	Ni testirana
Akutna okužba	Poz.	Neg. (redko poz.)	Ni testirana (nizka)
Pretekla okužba	Neg.	Poz.	Srednja ali visoka
Reaktivacija	Poz.	Poz.	Srednja ali visoka

Pri razlagi rezultatov moramo upoštevati tudi možnost lažno pozitivnih rezultatov. Ti so lahko posledica prisotnega revmatoidnega faktorja, ki je protitelo tipa IgM in reagira s protitelesi IgG. Zato moramo odstraniti revmatoidni faktor iz seruma. Do podobnih težav pride pri osebah, ki so okužene z virusom EBV in imajo prisotna heterofilna protitelesa IgM. Do lažno negativnega rezultata pa lahko pride v primeru, če se veže veliko protiteles CMV IgG namesto IgM. Temu se izognemo tako, da ločimo protitelesa IgG od IgM (Hodinka, 1999).

#### 2.1.4.3 Zdravljenje in preventiva

Ganciklovir zavira replikacijo vseh človeških virusov herpesa tako, da prepreči delovanje virusne DNA polimeraze in ni pomnoževanja nukleinske kisline. Pogosto ga uporabljamo pri terapiji, zlasti pri retinitisu. Zavrl naj bi razvoj gluhosti ali slepote, vendar ima preveč stranskih učinkov, da bi ga lahko uporabljali za zdravljenje otrok. Protivirusno učinkuje pri bolnikih s presajenimi organi oz. tkivi in imunskimi pomanjkljivostmi. Za nosečnice z akutno okužbo s citomegalovirusom še ni ustreznega zdravljenja. Aciklovir ni učinkovit, čeprav ga

uporabljammo pri zdravljenju ostalih okužb s herpesvirusi, npr: virus herpes simplex 1, virus herpes simplex 2 in virus varicella zoster. Dobre uspehe so dosegli tudi s cidofovirjem, ki naj bi bil primeren za zdravljenje okužb s herpesvirusi, ki niso občutljivi za aciklovir (Koren in Poljak, 2005; CDC, 2010).

Znanstveniki trenutno delajo na področju razvoja cepiva in testirajo tako oslABLJENA živa cepiva kot mrtva cepiva, ki vsebujejo zgolj virusne beljakovine. Iščejo še druge možnosti preprečevanja kongenitalne okužbe. Za nosečnice je priporočeno izogibanje stikom z okuženimi otroci, poostrena osebna higiena in uporaba kondomov. Določanje samega imunskega statusa pa je priporočljivo za imunokomprimirane osebe, mlade ženske in nosečnice, osebe, ki so vključene v program za presaditev organov, in za krvodajalce, saj se tako lahko izognemo morebitnim zapletom, ki so posledica okužbe z virusom CMV (CDC, 2010).

### **2.1.5 Virus Epstein Barr (EBV)**

Virus EBV uvrščamo v  $\gamma$  poddružino herpesvirusov. Je ubikvitaren virus. V Združenih državah Amerike naj bi bilo prekuženih kar 90-95 % vseh odraslih oseb; v Sloveniji predidevamo, da je situacija podobna. Virus EBV je primer povzročitelja trajne okužbe, ki je največkrat neškodljiv, vendar lahko v nekaterih primerih povzroča resna bolezenska stanja. Prenaša se s slino in virus lahko izločajo tudi asimptomatske osebe, ki so tako glavni vir. Vir prenosa je lahko tudi kri pri transfuziji. Prenos preko zraka pa naj ne bi bil pomemben (Cohen, 1998; Lennete, 1999).

Njegov premer je približno 120 nm, velikost genoma pa je 172 kbp. Na molekularnem nivoju naj bi ločili dva tipa, torej A oz. 1 in B oz. 2, kar je odvisno od polimorfizma EBNA genov. Oba tipa sta razširjena po vsem svetu, vendar prevladuje tip A, ki tudi veliko bolj učinkovito spreminja limfocite. Dvojna okužba doslej še ni znana (Lennete, 1999).

Enako kot citomegalovirus ima omejen nabor gostiteljev. Okuži zgolj celice, ki imajo izražen receptor za komponento komplekta C3d (CR2 ali CD21), kot so nekatere epitelijske celice ustnega in nosnega dela žrela, in B limfociti. Replikacija virusa EBV je počasna in poteka v celicah žrela. Poznamo semi-permisivno in permisivno replikacijo. Pri prvi so B limfociti izrabljeni za semi-permisivno replikacijo in okužba tako ostane latentna ali pa se celice transformirajo zaradi virusa. Ko so limfociti latentno okuženi, lahko v njih najdemo nekaj nepopolnih virusnih delcev oz. episomov, ki se podvojujejo skupaj s celico in se širijo naprej. Pri tem pride do izražanja zgodnjih genov, npr.: EBV jedrni antigeni, membranske DNA vezne beljakovine in RNA molekule. Membranske beljakovine so onkogene. Virus EBV se ohrani v limfocitih B in lahko pride do imortalizacije ter transformacije v limfom. Pri permisivni replikaciji je proces ravno nasproten, saj v epitelijskih celicah poteče celoten litični cikel. Izrazi se beljakovina ZEBRA, ki aktivira zgodnje gene, in nato pride do delovanja polimeraze ter replikacije DNA. Sestavi se celoten virus, ki se širi (Cohen, 1998; Lennete, 1999; Rowe in Zuo, 2010).

#### 2.1.5.1 Klinična slika

Pri klinični sliki okužbe z virusom Epstein Barr razlikujemo štiri vrste okužbe oz. bolezni:

- Latentna okužba, ki je najbolj pogosta.
- Infekcijska mononukleoza, ki se razvije pri približno 40% ljudi, ki se okužijo z virusom EBV med puberteto ali v zgodnji odrasli dobi. Je posledica tega, da limfociti T poskušajo odstraniti okužene limfocite B. Limfociti proizvajajo protitelesa proti različnim antigenom, nepovezanim z virusom EBV.
- Maligna obolenja, kot sta Burkittov limfom, ki je bil prva odkrita bolezen virusa EBV, nazofaringealni karcinom, ki je ubikvitaren, a še vedno najbolj pogost v jugovzhodni Aziji, T-celični limfomi, ki so v treh oblikah (hemofagocitni sindrom, limfom nosne votline, kože in prebavil ter angioimunoblastna limfadenopatija), in Hodgkinova bolezen.
- PTLD (post-transplantacijska limfoproliferativna bolezen), ki ogroža imunsko oslABLJENE osebe, ki prejemajo imunosupresivna zdravila (Cohen, 1998; Lennete, 1999;

Marin, 1999).

Okužba z virusom Epstein Barr lahko vodi v transformacijo celic. Virus se podvaja v epiteljskih celicah žrela. Sprošča se v slino in nato ga prevzamejo CD21+ B limfociti. Te celice so v normalnem stanju kratkoživeče in se uničijo z apoptozo. Kljub prisotnosti virusa celice ne kažejo kakršnih koli histoloških sprememb, ampak se stimulirano delijo in ne propadejo z apoptozo. To lahko opazimo kot povišano število monocitov v krvnem obtoku. Transformacija B celic vpliva na interakcije z drugimi sestavinami imunskega odziva. Izražajo se HLA markerji (humani levkocitni antigeni), CD23 antigeni in adhezijske beljakovine. Prisotnost virusa se kaže kot izražanje analoga interlevkina 10 (IL-10), ki inhibira izločanje gama interferona ( $\gamma$ -IFN). Posledica tega je preprečevanje T celičnega odgovora in pospešeno nastajanje B celic ter protiteles IgG. Celice proizvajajo še citokine IL-5 in IL-6 (interlevkin 5 in interlevkin 6) (Rowe in Zuo, 2010).

Pri primarni okužbi se redko razvijejo simptomi, vendar lahko bolniki izločajo virus še mnogo let. Infekcijska mononukleoza ima inkubacijsko dobo do dva meseca. Bolezen prepoznamo na podlagi simptomov: povečane bezgavke, tonzilitis, povečana vranica in jetra ter vročina, ki traja en teden ali dlje. Potek bolezni je odvisen od starosti bolnika, saj si mlajši mnogo hitreje opomorejo (okrevanje traja približno štiri tedne). Kljub temu, da je to velikokrat benigna bolezen, lahko pride do različnih zapletov, kot so nevrološke motnje (npr.: meningitis, encefalitis, mielitis, Guillain-Barre sindrom). Pojavijo se lahko tudi sekundarne okužbe, avtoimuna hemolitična anemija, trombocitopenija, agranulocitoza, aplastična anemija itd. Pri infekcijski mononukleozi se limfociti B transformirajo. Pride do proliferacije in aktivirajo se celice CD8 zaviralke. Te celice T se razlikujejo od normalnih in jih imenujemo Downey-eve celice. Število celic T se močno poveča in lahko predstavljajo do 80% belih krvnih celic. Posledično pride do povečanja bezgavk, jeter in vranice. Aktivacija celic T omeji proliferacijo celic B in simptomi izginejo. Če je celična imunost šibka, se lahko bolezen nadaljuje. Nekontrolirana virusna replikacija lahko vodi do limfoproliferacije celic B, levkopenije in celo limfoma. Pri bolnikih s T celično pomanjkljivostjo, ki se prenaša z ženskim kromosomom, pri



bolnikih z aidsom in bolnikih po presaditvi organov lahko pride zato do številnih zapletov (Cohen, 1998; Lennete, 1999; Auwaerter, 1999).

Viruse herpesa poleg adenovirusov, papovavirusov, hepadnavirusov in poksvirusov uvrščamo med onkogene viruse z DNA. Nekateri herpesvirusi povzročajo tumorje pri živalih (npr. virus Lucke, virus Marekove bolezni, virus sylvilagus, virus papio, virus atlas in virus saimiri), dva pa povezujemo s človeškimi rakavimi obolenji. To sta virus Epstein-Barr in humani herpesvirus 8. Včasih so z neoplazmami povezovali še virus herpes simplex 2, ki naj bi bil vključen pri nastanku raka na materničnem vratu, vendar so to kasneje ovrgli, in humani herpes virus 6 (Cohen, 1998; Marin, 1999; Koren, 2005b).

Povezava med Burkittovim limfomom in virusom Epstein Barr je znana že dolgo. To je tumor, ki nastane v žrelu in na obrazu pri otrocih. V tumorskih celicah najdemo virusno DNA in tumorske antigene, pacienti pa kažejo povišan nivo protiteles proti antigenom EBV v primerjavi z ostalo populacijo. Tumorske celice so monoklonalne in v njih pride do translokacije med kromosomi 8 in 14, 22 ali 2. To približa onkogen *c-myc* blizu gena za težko verigo za imunoglobuline, ki se aktivno izražajo. Ker je onkogen blizu promotorja, se začne le-ta pogosteje izražati. Tega pri infekcijski mononukleozi ne zaznamo. Biopsija tkiva pokaže velike večjedrne celice. Naslednji dokaz povezave med virusom in rakavim obolenjem je, da virus EBV lahko v celični kulturi transformira B limfocite. Poznamo tri vrste Burkittovega limfoma: endemski, neendemski in Burkittov limfom pri obolelih z aidsom. Limfom je endemičen pri otrocih, zlasti dečkih do 15. leta starosti, v ekvatorialni Afriki, obalnem pasu Nove Gvineje in se redko pojavlja drugje. Tukaj je prisoten tudi povzročitelj malarije *Plasmodium falciparum*, ki predstavlja poleg virusa HIV dodaten dražljaj za proliferacijo limfocitov B. Razvije se v spodnji čeljusti, izjemoma očnici ali v osrednjem živčevju. Neendemski Burkittov limfom se pojavlja pri odraslih v Evropi, Severni in Južni Ameriki ter severni Afriki. Nastane v trebušni votlini, redko v spodnji čeljustnici in v očnici. Tretja oblika se pojavi pred popolno odpovedjo imunskega sistema (Marin, 1999; Koren, 2005b).

Nazofaringealni rak je bolezen, ki se pojavlja na številnih področjih, npr. južna Kitajska, Aljaska, Tunizija, vzhodna Afrika itd., in naj bi bila ravno tako povezana z okužbo z virusom EBV. Morebiti tukaj pomembno vlogo igrajo genetske predispozicije ali pa igra pomembno vlogo okoljski dejavnik. To je tumor epitelijskega zgornjega respiratornega trakta in celic z DNA virusa EBV. Titer protiteles se povečuje z napredovanjem tumorja (Marin, 1999; Koren, 2005b).

Oralna levkoplakija se razvije pri osebah z virusom HIV. Opazimo jo kot patološke spremembe v ustih (Cohen, 1998).

#### 2.1.5.2 Določanje okužbe z virusom Epstein Barr

Okužbo z virusom Epstein Barr lahko dokažemo posredno ali neposredno. Kot ustrezen vzorec lahko uporabimo serum, tkivo bezgavk, vranice, jeter, biopsijsko tkivo tumorjev, izjemoma lahko tudi cerebrospinalno tekočino (Lennete, 1999).

##### 2.1.5.2.1 Neposredne metode dokazovanja

Med direktne metode prištevamo:

- Elektronsko mikroskopijo: uporabno zgolj pri vzorcih patoloških sprememb na jeziku in pri pacientih z oralno levkoplakijo.
- Imunoflorescenco: možnost kombiniranja s histokemičnim barvanjem.
- Hibridizacija (in situ, citohibridizacija, dot blot, Southern blot): detekcija nukleinskih kislin.
- PCR: detekcija nukleinskih kislin, vendar se pri tem pojavljajo težave zaradi trajne okužbe z virusom EBV. Izjemoma je v uporabi pri določanju virusa EBV v likvorju pri osebah z limfomom v primarnem centralnem sistemu (Lennete, 1999).

Isolacija ni priporočljiva in je trenutno mogoča samo v človeških B limfocitih fetusa, kar pa je še vedno bolj ali manj neuspešno (Lennete, 1999).

#### 2.1.5.2.2 Posredne metode dokazovanja

S posrednimi metodami dokazujemo prisotnost specifičnih protiteles, ki so uperjena proti specifičnim antigenom. Za to lahko uporabimo različne serološke teste, s katerimi lahko zaznamo protitelesa proti nativnim ali rekombinantnim antigenom.

Diagnozo lahko postavimo s pomočjo krvnega razmaza, kjer lahko opazimo atipične limfocite. Lahko pa dokažemo heterofilna protitelesa, ki jih proizvajajo proliferacijske B celice in so protitelesa razreda IgM. Heterofilna protitelesa zaznamo pri mladostnikih in odraslih osebah z infekcijsko mononukleozo v 85 do 90 %, vendar jih lahko dokažemo tudi pri bolnikih, ki prebolevajo kakšno drugo okužbo. Heterofilna protitelesa IgM niso specifična za virus EBV (Hess, 2004). Protitelesa IgM reagirajo z antigenom Paul-Bunnell na ovčjih, konjskih in kozjih rdečih krvničkah. Pri nastanku konjugata med protitelesi in antigenom pride do aglutinacije eritrocitov. Pri majhnih otrocih, mlajših od pet let, dobimo lažno negativne rezultate v 50 %, saj pri njih ne pride do poliklonske stimulacije. Prav tako lahko dobimo lažno negativen rezultat, če testiramo serum odvzet le teden dni po okužbi z virusom EBV, in pri nekaterih osebah z avtoimunskimi boleznimi. Lažno pozitivni rezultati so redkejši in jih lahko dobimo pri osebah, ki ne kažejo kakršnih koli simptomov kljub sveži okužbi. Rezultati testa so okvirni, zato je priporočljivo, da uporabimo še druge bolj specifične teste za dokazovanje protiteles proti virusu EBV (Golaszewska in sod., 2003).

Na podlagi dokazovanja protiteles, specifičnih za virus EBV (VCA IgM oz. EBV IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG), lahko ločimo okužbo s tem virusom od okužb z virusom CMV, adenovirusi ali parazitom *Toxoplasma gondii*. Protitelesa EBV IgM nastanejo na podlagi odziva na virusni kapsidni antigen kmalu po okužbi in izginejo po štirih od šestih tednih. Protitelesa VCA IgG nastanejo v akutni fazi in dosežejo vrh po dveh do štirih tednih, nato upadejo, a ostanejo vse življenje. Protitelesa za zgodnji antigen EA IgG se ravno tako pojavijo v akutni fazi in padejo pod mejo zaznavanja po treh do šestih mesecih. Če zaznamo prisotnost protiteles EA IgG, to pri večini ljudi nakazuje na aktivno okužbo. EBNA IgG so protitelesa za

jedrne antigene in jih ne zaznamo v akutni fazi, temveč se pojavijo šele kasneje in ostanejo doživljenjsko (Cohen, 1998; Kirov in sod., 1989; Lennete, 1999).

Interpretacija rezultatov laboratorijskih testov je zapletena in potrebno je obširno predhodno znanje in poznavanje bolnikove zgodovine. Oseba, ki nima protiteles VCA IgG ali EBV IgM, še ni prišla v stik z virusom EBV. Primarno okužbo nakazuje prisotnost protiteles EBV IgM ali VCA IgG in odsotnost EBNA IgG. Večina ljudi z aktivno EBV okužbo proizvaja protitelesa EA IgG. Če zaznamo protitelesa VCA IgG in EBNA IgG, lahko rečemo, da je to znak pretekle okužbe (najmanj štiri do šest mesecev kasneje ali celo leto nazaj). Ko pride do reaktivacije virusa, so prisotna tako protitelesa EBNA IgG in EA IgG kot tudi EBV IgM. Vendar imamo pri tem velike težave z obrazložitvijo rezultatov, saj protitelesa EBV IgM lahko ostanejo pri nekaterih pacientih zaznavna še dolgo po primarni okužbi in posledično težko ločimo primarno okužbo od reaktivacije. Podobno je z EA IgG, ki ne izginejo takoj (Cohen, 1998; Lennete, 1999; Auwaerter, 1999). Najboljši pokazatelj naj bi bila avidnost protiteles VCA IgG ali EA IgG (Preglednica 2). Nekateri raziskovalci so ponudili kot dodatno možnost določanje protiteles ZEBRA IgG, saj je beljakovina ZEBRA ključna pri kontroli prehoda EBV iz latentnega v aktivno stanje. Tega niso sprejeli, saj se pogosto pojavlja pri osebah, ki imajo infekcijsko mononukleozo ali nazofaringealni karcinom. Tako še danes nimamo točno določenega kriterija, ki bi potrdil reaktivacijo virusa s serološkimi metodami (Aalto in sod., 1998).

Preglednica 2: Predvidena diagnoza glede na prisotnost protiteles proti virusu EBV (Aalto in sod., 1998).

Diagnoza	EBV IgM	VCA IgG	EBNA IgG	EA IgG
Ni okužbe	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Akutna okužba	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.
Pretekla okužba	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.
Reaktivacija	Poz.	Poz.	Poz.	Neg./Poz.

### 2.1.5.2 Zdravljenje in preventiva

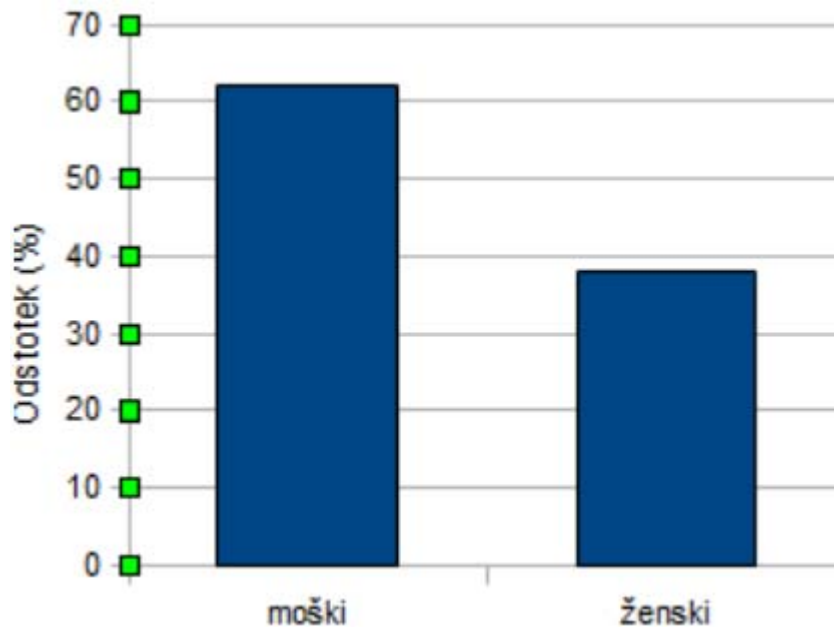
Za zdravljenje okužb z virusom Epstein Barr še ne poznamo ustreznih zdravil. To predvsem otežuje odsotnost virusne timidinske kinaze, na katero deluje aciklovir in analogi, s katerimi zdravimo okužbe z virusom HSV. Cepiva še ni na razpolago (Lennete, 1999).

### 3 MATERIALI IN METODE DE LA

#### 3.1 VZORCI

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani izvajajo rutinsko testiranje na citomegalovirus in virus Epstein Barr. V serumih določajo prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG ter avidnost protiteles razreda IgG usmerjenih proti citomegalovirusu. Protitelesa EBV IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG ter avidnost proti virusu EBV prav tako pregledujejo po enakem sistemu. Pri testiranju serumov uporabljajo diagnostični sistem Liaison, ki omogoča izvajanje imunskih testov. Serumi so bili po rutinskem testiranju zamrznjeni in shranjeni pri -30 °C. Da bi se izognili večkratnemu oddaljevanju in zamrzovanju serumov, smo jih med testiranjem hranili na temperaturi od 2 do 8 °C.

Od 1. januarja 2009 do 31. decembra 2009 je bilo rutinsko skupno testiranih 2152 serumov na prisotnost protiteles CMV IgM in CMV IgG. Rezultati so bili pridobljeni z diagnostičnim sistemom Liaison. Med 2152 testiranimi serumi smo se osredotočili na 171 vzorcev, v katerih smo dokazali prisotnost protiteles CMV IgM. Med temi vzorci smo nato izbrali osebe, ki so bile v času testiranja starejše od 13 let, saj smo predpostavili, da je za njih bolj verjetno, da so že prišle v stik z virusom Epstein Barr. Za nadaljnje delo smo nato uporabili 136 vzorcev. Za vseh 136 vzorcev smo nato zbrali podatke o prisotnosti protiteles CMV IgG in njihovi avidnosti ter prisotnosti protiteles proti virusu Epstein Barr. Manjkajoče podatke smo pridobili z dodatnimi testiranjem serumov z aparatom Liaison. Med 136 vzorci smo imeli 22 oseb, ki so imele testirana dva seruma, in tri osebe, ki so imele testirane tri serume, zato smo izločili parne serume osemindvajsetih oseb in upoštevali zgolj rezultate prvega odvzetega seruma. Natančno smo analizirali 108 pacientov, med katerimi je bilo 38 % žensk (41 oseb, povprečna starost 38,9 let) in 62 % moških (66 oseb, povprečna starost 38 let) (Slika 1). Povprečna starost pacientov je bila 38 let, najmlajši pacient je bil star 13 let, najstarejši pa 79 let.



Slika 1: Stolpčni prikaz deleža moških in žensk vključenih v raziskavo.

### 3.2 METODE

Pri izvedbi diplomske naloge smo uporabljali dva diagnostična sistema. Z obema smo delali v skladu z navodili proizvajalca.

#### 3.2.1 Diagnostični sistem Liaison

**Diagnostični sistem Liaison** proizvajalca DiaSorin (Vercelli, Italija) je v uporabi za določanje protiteles tako proti citomegalovirusu kot proti virusu Epstein Barr. To je avtomatiziran sistem, ki je namenjen posrednemu dokazovanju protiteles z metodo kemiluminiscence (CLIA, oddajanje svetlobe kot posledica kemične reakcije). Pri tem uporabljamo t.i. »integrale«, ki so plastični kontejnerji s potrebnimi reagenti za teste in so specifični za določen parameter merjenja. Istočasno lahko izvedemo merjenje različnih parametrov z uporabo več integralov hkrati. Tako lahko kvantitativno določimo specifična protitelesa, ki so prisotna v serumu ali plazmi.

### 3.2.1.1 Določanje protiteles CMV IgM

#### 3.2.1.1.1 Princip metode

Posredni kemoluminiscenčni test je kvantitativna metoda, s katero lahko določimo specifična protitelesa IgM proti antigenom citomegalovirusa. Kot antigen uporabljamo rekombinantni polipeptid, s katerim so prekriti magnetni delci (t.i. trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa, ki tvorijo konjugat skupaj z izoluminolom. Pri prvi inkubaciji se protitelesa CMV IgM, če so prisotna v kalibratorju, vzorcu ali kontroli, vežejo na rekombinantne beljakovine. Sledi spiranje odvečnega materiala. Med drugo inkubacijo konjugati reagirajo s protitelesi CMV IgM, ki so vezana na trdno fazo. Ponovno se spere nevezan material. Dodamo vzbujevalne reagente in nastane kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobni signal merimo s fotopomnoževalnikom v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih vezanih protiteles CMV IgM v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

#### 3.2.1.1.2 Območje merjenja

Aparat avtomatsko preračuna, kolikšna je količina protiteles CMV IgM v U/ml in ovrednoti rezultat. Območje merjenja je med 0 in 240 U/ml. V kolikor koncentracija protiteles CMV IgM presega območje merjenja, lahko uporabimo funkcije redčenja. Vzorec nato ponovno testiramo, pri rezultatih pa je redčitveni faktor upoštevan.

#### 3.2.1.1.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles CMV IgM nižja kot 25 U/ml.
- Mejna vrednost, če je koncentracija protiteles CMV IgM med 25 in 30 U/ml.
- Pozitivni, če je koncentracija protiteles CMV IgM enaka ali višja kot 30 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.1.2 Določanje protiteles CMV IgG

#### 3.2.1.2.1 Princip metode



Posredni kemoluminiscenčni test je kvantitativna metoda, s katero lahko določimo specifična protitelesa IgG proti citomegalovirusu. Magnetni delci (t.i. trdna faza) so prekriti z rekombinantnimi polipeptidi. Mišja monoklonska protitelesa tvorijo konjugat skupaj z izoluminolom. Med prvo inkubacijo se protitelesa CMV IgG, če so prisotna v kalibratorju, vzorcu ali kontroli, vežejo na rekombinantne beljakovine. Sledi spiranje odvečnega materiala. Med drugo inkubacijo konjugati reagirajo s protitelesi CMV IgG, ki so vezana na trdno fazo. Nevezan material ponovno izperemo. Dodamo vzbujevalne reagente in nastane kemiluminiscenčna reakcija. S fotopomnoževalnikom merimo svetlobni signal v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih vezanih protiteles CMV IgG v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

#### 3.2.1.2.2 Območje merjenja

Aparat avtomatsko preračuna, kolikšna je količina protiteles CMV IgG v U/ml in ovrednoti rezultate. Območje merjenja je med 0 in 22 U/ml CMV IgG. V kolikor imamo v vzorcih višjo koncentracijo protiteles, lahko izberemo redčenje s funkcijo aparata in ponovno testiramo redčine. Rezultati bodo nato avtomatsko pomnoženi z redčitvenim faktorjem.

#### 3.2.1.2.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles CMV IgG pod 0,4 U/ml.
- Mejna vrednost, če je koncentracija protiteles CMV IgG med 0,4 in 0,6 U/ml.
- Pozitivni, če je koncentracija protiteles CMV IgG enaka ali višja kot 0,6 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.1.3 Določanje avidnosti protiteles CMV IgG

#### 3.2.1.3.1 Princip metode

Za določanje avidnosti protiteles CMV IgG uporabljamo posredni kemiluminiscenčni imunski test. Kot vzorec lahko uporabimo serum ali plazmo. Pri testu uporabimo magnetne delce, ki so prevlečeni z antigeni citomegalovirusa in predstavljajo trdno fazo. Mišja monoklonska protitelesa tvorijo konjugat skupaj z derivatom izoluminola in so uperjena proti človeškim protitelesom CMV IgM, ki so vezana na antigen. Jakost vezi med protitelesi CMV IgG in antigeni v trdni fazi predstavlja avidnost protiteles. Rezultat dobimo s primerjavo signala iz referenčnega vzorca. Med prvo inkubacijo se specifična protitelesa CMV IgG, ki so v kalibratorju, vzorcu ali kontroli, vežejo na trdno fazo. Nevezane reagente speremo, potem pa dodamo še disociativni reagent, ki deluje na vezi med protitelesi in antigeni. Vezana ostanejo samo protitelesa z visoko avidnostjo, ostala pa se odstranijo. Ponovno spiramo odvečni material. Temu sledi inkubacija s konjugatom mišjega protitelesa in derivata izoluminola, ki reagira se preostalimi vezanimi protitelesi. Nato speremo nevezan material in dodamo vzbujevalni reagent, ki sproži kemiluminiscenčno reakcijo. S fotopomnoževalnikom izmerimo jakost svetlobnega signala v relativnih svetlobnih enotah (RLU), ki so sorazmerne s koncentracijo protiteles CMV IgG. Indeks avidnosti protiteles CMV IgG dobimo tako, da izračunamo razmerje med vzorci, ki so obdelani z ureo, in referenčnimi vzorci, ki niso bili obdelani z ureo.

#### 3.2.1.3.2 Območje merjenja

Testiramo lahko samo vzorce, ki imajo prisotnih več kot 0,6 U/ml CMV IgG protiteles, sicer lahko pride do napačne interpretacije. Območje merjenja je med 0,0 in 1,0. V kolikor imamo previsoko koncentracijo CMV IgG protiteles (nad 22 U/ml), je priporočljivo redčenje in ponovno testiranje. Rezultati so kasneje računalniško pomnoženi z redčitvenim faktorjem in avidnost je podana. V kolikor je rezultat avidnost višji kot 0,950, je priporočljiva ponovitev testa. Če je rezultat potrjen, ga označimo kot visoko avidnost.

### 3.2.1.3.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati so opredeljeni kot:

- Nizka avidnost, če je avidnost protiteles CMV IgG pod 0,2.
- Srednja avidnost, če je avidnost protiteles CMV IgG med 0,2 in 0,3.
- Visoka avidnost, če je avidnost protiteles CMV IgG enaka ali višja kot 0,3.

### 3.2.1.4 Določanje protiteles EBV IgM

#### 3.2.1.4.1 Princip metode

Kemiluminiscenčna reakcija je osnova te metode, ki jo uporabljamo za kvantitativno določanje specifičnih protiteles EBV IgM, ki so prisotna v serumu ali plazmi. Uporabljamo sintetični peptid, s katerim so obdani magnetni delci trdne faze, in mišja monoklonska protitelesa, ki so vezana z derivatom izoluminola. Protitelesa EBV IgM iz kalibratorja, vzorca ali kontrole se med prvo inkubacijo vežejo na trdno fazo. Sledi spiranje in nato so dodana mišja monoklonska protitelesa, ki reagirajo z EBV IgM, ki tvorijo konjugat z antigenskim peptidom. Po koncu inkubacije sledi spiranje. Ob dodatku vzbujevalnega reagenta nastane kemiluminiscenčna reakcija, ki jo spremljamo s pomočjo fotopomnoževalnika. Svetlobni signal, ki ga merimo v relativnih svetlobnih enotah (RLU), nam pove koncentracijo protiteles EBV IgM iz kalibratorja, vzorca ali kontrole, ki so vezana.

#### 3.2.1.4.2 Območje merjenja

Koncentracijo protiteles EBV IgM aparat avtomatsko preračuna in jo poda v U/ml ter ovrednoti rezultate. Območje merjenja je med 0 in 160 U/ml. V kolikor koncentracija protiteles EBV IgM presega območje merjenja, uporabimo funkcijo redčenja. Vzorec nato ponovno testiramo, pri rezultatih pa je redčitveni faktor upoštevan.

#### 3.2.1.4.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles EBV IgM nižja kot 20 U/ml.
- Mejna vrednost, če je koncentracija protiteles EBV IgM med 20 in 40 U/ml.
- Pozitivni, če je koncentracija protiteles EBV IgM enaka ali višja kot 40 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.1.5 Določanje protiteles VCA IgG

#### 3.2.1.5.1 Princip metode

Posredni kemoluminiscenčni test je kvantitativna metoda. S to metodo lahko določimo specifična protitelesa IgG proti kapsidnemu antigenu pri virusu Epstein Barr. Uporabljamo rekombinantni polipeptid, s katerim so prekriti magnetni delci (t.i. trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa, ki tvorijo konjugat skupaj z derivatom izoluminola. Med prvo inkubacijo se protitelesa VCA IgG, če so prisotna v kalibratorju, vzorcu ali kontroli, vežejo na rekombinantne beljakovine virusa. Odvečni material speremo. Med drugo inkubacijo mišji konjugati reagirajo s protitelesi VCA IgG, ki so vezana na trdno fazo. Ponovno se spere nevezan material. Po dodatku vzbujevalnega reagenta nastane kemiluminiscenčna reakcija. S fotopomnoževalnikom merimo svetlobni signal v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih vezanih protiteles VCA IgG v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

#### 3.2.1.5.2 Območje merjenja

Aparat avtomatsko preračuna, kolikšna je koncentracija protiteles VCA IgG v U/ml in ovrednoti rezultate. Območje merjenja je med 0 in 750 U/ml EA IgG. V kolikor imamo v vzorcih višjo koncentracijo protiteles, lahko uporabimo redčenje s funkcijo aparata in ponovno testiramo redčine. Rezultati bodo nato avtomatsko pomnoženi z redčitvenim faktorjem.

#### 3.2.1.5.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles VCA IgG pod 20 U/ml.

- Pozitivni, če je koncentracija protiteles VCA IgG enaka ali višja kot 20 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.1.6 Določanje protiteles EA IgG

#### 3.2.1.6.1 Princip metode

Posredni kemoluminiscenčni test je kvantitativna metoda, s katero lahko določimo specifična protitelesa IgG proti zgodnjemu antigenu pri virusu Epstein Barr. Uporabljamo rekombinantni polipeptid, s katerim so prekriti magnetni delci (t.i. trdna faza), in mišja monoklonska protitelesa, ki tvorijo konjugat skupaj z izoluminolom. Pri prvi inkubaciji se protitelesa EA IgG, če so prisotna v kalibratorju, vzorcu ali kontroli, vežejo na rekombinantne beljakovine EA. Sledi spiranje odvečnega materiala. Med drugo inkubacijo konjugati reagirajo s protitelesi EA IgG, ki so vezana na trdno fazo. Ponovno se spere nevezan material. Dodamo vzbujevalne reagentne in nastane kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobni signal merimo s fotopomnoževalnikom v relativnih svetlobnih enotah (RLU). Količina signala je sorazmerna s koncentracijo prisotnih vezanih protiteles EA IgG v kalibratorju, vzorcu ali kontroli.

#### 3.2.1.6.2 Območje merjenja

Aparat avtomatsko preračuna, kolikšna je količina protiteles EA IgG v U/ml in ovrednoti rezultate. Območje merjenja je med 0 in 150 U/ml EA IgG. V kolikor imamo v vzorcih višjo koncentracijo protiteles, uporabimo redčenje s funkcijo aparata in ponovno testiramo redčine. Rezultati so nato avtomatsko pomnoženi z redčitvenim faktorjem.

#### 3.2.1.6.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles EA IgG pod 10 U/ml.
- Mejna vrednost, če je koncentracija protiteles EA IgG med 10 in 40 U/ml.
- Pozitivni, če je koncentracija protiteles EA IgG enaka ali višja kot 40 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.1.7 Določanje protiteles EBNA IgG

#### 3.2.1.7.1 Princip metode

Metoda temelji na kemiluminiscenčni reakciji in je uporabna za kvantitativno določanje specifičnih protiteles EBNA IgG, ki so prisotna v serumu ali plazmi. Uporabljamo sintetični peptid EBNA-1, s katerim so obdani magnetni delci trdne faze, in mišja monoklonska protitelesa, ki so vezana z izoluminolnim derivatom. Med prvo inkubacijo se protitelesa EBNA IgG iz kalibratorja, vzorca ali kontrole vežejo na trdno fazo. Temu sledi spiranje in nato so dodana mišja monoklonska protitelesa, ki reagirajo z EBNA IgG, ki tvorijo konjugat s peptidom EBNA-1. Po koncu inkubacije sledi spiranje. Ko dodamo še vzbujevalni reagent, nastane kemiluminiscenčna reakcija, ki jo spremljamo s pomočjo fotopomnoževalnika. Svetlobni signal, ki ga merimo v relativnih svetlobnih enotah (RLU), nam pove koliko protiteles EBNA IgG iz kalibratorja, vzorca ali kontrole je vezanih.

#### 3.2.1.6.2 Območje merjenja

Aparat avtomatsko preračuna, kolikšna je količina protiteles EBNA IgG v U/ml in ovrednoti rezultat. Območje merjenja je med 0 in 600 U/ml. V kolikor koncentracija protiteles EBNA IgG presega območje merjenja, uporabimo funkcijo redčenja. Vzorec nato ponovno testiramo, pri rezultatih pa je redčitveni faktor upoštevan.

#### 3.2.1.7.3 Vrednotenje rezultatov

Rezultati vzorcev so opredeljeni kot:

- Negativni, če je koncentracija protiteles EBNA IgG nižja kot 5 U/ml.
- Mejna vrednost, če je koncentracija protiteles EBNA IgG med 5 in 20 U/ml.
- Pozitivni, če je koncentracija protiteles EBNA IgG enaka ali višja kot 20 U/ml.

(U/ml je enota na mililiter.)

### 3.2.2 *recomLine EBV IgG (avidity) (IgA) in recomLine EBV IgM*

Do sedaj še ni bila odkrita ustrezna celična kultura, ki bi jo lahko uporabili za gojenje virusa Epstein Barr. Ravno tako ni bila zadostno učinkovita ekstrakcija virusnih beljakovin za serološko testiranje, zato so razvili rekombinantne beljakovine, ki omogočajo tarčno določanje v diagnostiki.

Uporabili smo *recomLine EBV IgG (Avidity) (IgA)*, *IgM test* (Mikrogen, Nemčija). V test so vključeni različni rekombinantni analogi antigenov EBV. Imunološki test je zasnovan na rekombinantnih beljakovinah, s katerimi lahko določimo prisotnost protiteles IgM, IgG in IgA ter avidnost protiteles IgG proti virusu Epstein Barr v serumu ali plazmi. *recomLine EBV* je kvalitativen *in vitro* test, ki ga lahko uporabimo za pridobivanje dodatnih informacij za določanje stopnje okužbe z virusom Epstein Barr.

#### 3.2.2.1 Princip metode

Očiščene rekombinantne beljakovine so nanesene na nitrocelulozno membrano, ki je nato razrezana na posamezne trakove. Antigeni na traku *recomLine EBV IgG (Avidity) (IgA)*, krajše LEBG, se razlikujejo od tistih, ki so na traku *recomLine EBV IgM*, krajše LEBM. To pomeni, da lahko za določanje protiteles IgA, IgG in avidnosti le-teh uporabimo samo LEBG trak, LEBM trak pa je namenjen določanju protiteles IgM.

Kontrolni pasovi so nanizani drug ob drugem na koncu testnega traku:

- Reakcijski kontrolni pas je poleg številke traku in ga moramo zaznati pri uporabi kakršnega koli seruma, saj je dokaz, da je bila reakcija pravilno izvedena.
- Konjugatni kontrolni pasovi služijo kot kontrola za določen razred protiteles. IgG in IgA konjugatni kontrolni pas sta zgolj na LEBG traku, IgM konjugatni kontrolni pas pa je le na LEBM traku.
- Mejni kontrolni pas uporabimo za kontrolo obarvanja in pomoč pri evalvaciji rezultatov reakcije. Intenzivnost obarvanja tega pasu je osnova za vrednotenje

reaktivnosti protiteles kot pozitivno, mejno vrednost ali negativno (Slika 2).

Kontrolnim pasovom sledijo pasovi z rekombinantnimi beljakovinami (Preglednica 3). Na testnem traku LEBG imamo šest, na testnem traku LEBM pa štiri pasove različnih rekombinantnih beljakovin.

Preglednica 3: Antigeni EBV in njihovi uporabljeni rekombinantni analogi pri testu imunoblot (Mikrogen, 2008).

<b>Antigeni EBV in njihovi rekombinantni analogi</b>		
Jedrni anitgen	EBNA-1	r-p72
Kapsidni antigen/strukturni antigen	VCA	r-p23, r-p18
Takojšnji zgodnji antigen	IEA	BZLF1, ZEBRA peptid
Zgodnji antigen	EA	r-p54, r-p138

Antigeni, ki jih uporabimo za detekcijo in identifikacijo protiteles IgG, IgA ali IgM, so specifični za ključne beljakovine virusa Epstein Barr. BZLF1 predstavlja bralni okvir beljakovine ZEBRA (BamHI Z Epstein Barr replikacijski aktivator) v genskem zapisu virusa EBV. Zaradi boljšega razumevanja je celotna beljakovina poimenovana BZLF1, krajši fragment beljakovine ZEBRA pa je označen kot ZEBRA. BZLF1 zaznavajo predvsem zgodaj prisotna, zelo reaktivna protitelesa IgM.

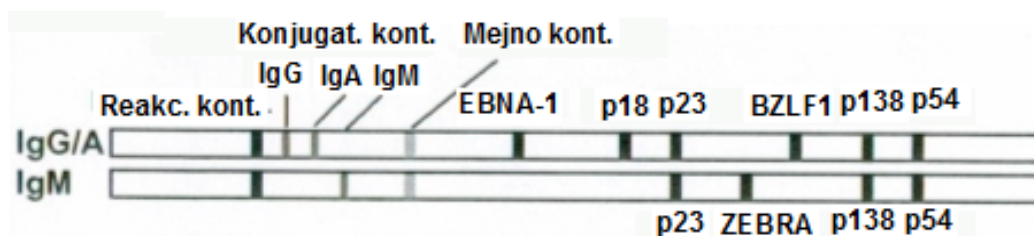
Na testnem traku LEBG so naneseni v naslednjem vrstnem redu ( Slika 2):

- EBNA-1,
- p18,
- p23,
- BZLF1,
- p138 in
- p54.



Na testnem traku LEBM pa je sledeči vrstni red ( Slika 2):

- p23,
- ZEBRA,
- p138 in
- p54.



Slika 2: Trak *recomLine* EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM (Mikrogen, 2008).

### 3.2.2.2 Potek testa

Test poteka pri sobni temperaturi, prav tako morajo biti reagenti ogreti na sobno temperaturo.

Najprej trakove inkubiramo z razredčino vzorca seruma, pri čemer se morebitna prisotna protitelesa vežejo na antigene na traku. Nevezana protitelesa speremo in inkubiramo trakove z anti-humanimi protitelesi IgG, IgM in IgA, ki imajo vezano hrenovo peroksidazo. Specifično vezana protitelesa nato zaznamo v barvni reakciji, ki jo katalizira peroksidaza. Če je prišlo do nastanka konjugata med antigenom in protitelesom, to vidimo kot temen pas na določenem mestu na traku.

Na stresalnik položimo banjico s predelki. V vsak predelek odpipetiramo 2 ml spiralnega pufra. V vsak predelek s plastično pinceto previdno potopimo en testni trak. Paziti moramo, da je trak obrnjen z oznako navzgor. Ko so trakovi popolnoma omočeni s spiralnim pufrom,

dodamo na en konec posameznega predelka 20  $\mu$ l vzorca (v našem primeru seruma). Vzorec resuspendiramo v spiralnem pufru in banjico pokrijemo s plastičnim pokrovom. Inkubiramo eno uro ob rahlem tresenju.

Po enurni inkubaciji banjico odkrijemo in posesamo vso tekočino iz posameznega predelka. Pri tem moramo biti pazljivi, da nastavek po vsakem sesanju dobro speremo z destilirano vodo, da se izognemo navzkrižnim kontaminacijam. V vsak predelek nato dodamo 2 ml spiralnega pufra in nežno stresamo pet minut. Spiralni pufer posesamo in postopek ponovimo še dvakrat.

Po spiranju v vsak predelek dodamo 2ml raztopine konjugata in pazimo, da so testni trakovi popolnoma potopljeni v tekočino. Banjico pokrijemo. Sledi 45-minutna inkubacija z rahlim stresanjem.

Raztopino konjugata temeljito posesamo. Nato v vsak predelek damo 2 ml spiralnega pufra in trakove ob stresanju spiramo pet minut. Spiralni pufer posesamo in postopek ponovimo še dvakrat.

V posamezni predelek s testnim trakom dodamo 1,5 ml raztopine substrata in med nežnim stresanjem inkubiramo 5-10 minut. Ko se pojavi nežna obarvanost na mejnem kontrolnem pasu, reakcijo ustavimo.

Raztopino substrata posesamo in trakove takoj trikrat speremo z 2 ml deionizirane vode. Trakove s plastično pinceto previdno primemo na označenem koncu in jih položimo med dve plasti papirja, da se bo adsorbirala odvečna tekočina iz njih. Tako jih sušimo dve uri. Trakove nato prilepimo na evalvacijski obrazec in ocenimo rezultate. Da ne pride do bledenja rezultatov, jih hranimo v temi oz. jih ne izpostavljam neposredni sončni svetlobi.

### 3.2.2.3 Vrednotenje rezultatov

Test lahko ovrednotimo, če je zadoščeno sledečim kriterijem:

- reakcijski kontrolni pas mora biti temno obarvan,
- mora biti pozitivna kontrola konjugata, ki razvije močnejšo barvno reakcijo kot kontrolni mejni pas, in
- barvni mejni pas se mora šibko, a razločno obarvati.

Pri interpretaciji rezultatov si nato pomagamo s primerjavo z barvnim mejnim pasom (Preglednica 4).

Preglednica 4: Intenzivnost reakcijskih pasov v primerjavi z mejnim kontrolnim pasom pri metodi *recomLine* (Mikrogen, 2008).

Reakcijski pasovi	Intenzivnost barvne reakcije
Ni reakcije	-
Intenzivnost manjša kot mejni barvni pas	- +
Enaka intenzivnost kot mejni barvni pas	+
Večja intenzivnost kot mejni barvni pas	+ +
Zelo močna intenziteta	+ + +

Pri izvajanju testa lahko opazimo, da pride do različne obarvanosti. Največkrat pride do bolj intenzivnega obarvanja in bolj izrazitih barvnih pasov pri IgG *recomLine* kot pri IgM. Intenzivnost beljakovinskih pasov je odvisna od koncentracije specifičnih protiteles proti virusu EBV.

Nekateri serumi lahko prispevajo k celovitemu obarvanju testnega lističa; npr. pri bolnikih, ki imajo alergijo na mlečne beljakovine. Ovrednotenje tovrstnih testnih lističev je oteženo in je priporočena uporaba inverznih pasov (beli pasovi na temni podlagi, ki so označeni kot negativni) ali pa drugih seroloških metod.

Vzorec lahko označimo kot EBV reaktiven, če imamo vsaj en pas enake intenzitete kot mejni barvni pas. Negativen vzorec pa je tisti, pri katerem nimamo reakcijskih barvnih pasov ali pa imajo ti šibkejšo intenziteto kot mejni barvni pas. Pri dokončnem določanju EBV statusa pa

moramo vedno upoštevati rezultate tako za protitelesa EBV IgG kot za EBV IgM. Pri tem se poslužujemo sledečih vzorcev (Preglednica 5 in Preglednica 6):

Preglednica 5: Ključni antigeni za ločevanje med različnimi bolezenskimi stopnjami (Mikrogen 2008).

Reakcijski antigen	Klasifikacija	Ocena EBV statusa
EBNA-1	p72 Epstein-Barr jedrni antigen 1	Titer IgG protiteles je odsoten pri primarni okužbi, povišan je pri preteklih okužbah.
p18	VCA (virusni kapsidni antigen)	Pri primarnih okužbah nimamo titra IgG protiteles in je povišan pri preteklih okužbah.
p23	VCA (virusni kapsidni antigen)	IgM in IgG protitelesa prisotna na začetku, po okužbi z EBV. Pri preteklih okužbah lahko še vedno zaznamo IgG protitelesa.
ZEBRA	IEA (takojšen zgodnji antigen), peptidni fragment beljakovine BZLF1	IgM protitelesa so lahko zaznavna v vseh stopnjah bolezni, razen pri pretekli okužbi. Protitelesa lahko zaznamo v zgodnji fazi primarne okužbe z EBV.
BZLF 1	IEA (takojšen zgodnji antigen)	V začetnih stopnjah okužbe z EBV lahko zaznamo IgG in IgA protitelesa, IgG pa lahko še vedno zaznamo pri preteklih okužbah.
p138 in p54	EA (zgodnji antigen)	Protitelesa IgG, IgM in IgA lahko zaznamo v vseh stopnjah okužbe razen pri pretekli okužbi.

Preglednica 6: Razlaga reaktivnosti med virusnimi antigeni in specifičnimi protitelesi (Mikrogen, 2008).

Status protiteles	Status bolnika
IgG: EBNA-1 in p18 negativna (možna so p23, BZLF1 in EA).  IgM: EA (p54 in/ali p138) in/ali ZEBRA pozitivna (možno je p23).	Primarna okužba oz. infekcijska mononukleoza.
IgG: EBNA-1 in/ali p18 pozitivna, p23 in BZLF1 pogosto pozitivna, možen šibek EA titer.  IgM: negativna.	Pretekla okužba.
IgG: kot pri pretekli okužbi, le da je prisotna še reaktivnost na EA antigene.  IgM: šibka reaktivnost za EA in/ali ZEBRA in/ali p23.	Sekundarna reaktivacija (ni kliničnih znakov).
IgG: močna reaktivnost proti vsem antigenom, včasih odsotna EBNA-1 protitelesa.  IgM: možne so šibke reaktivnosti.  IgA: jasna reaktivnost za EA in/ali BZLF1 in/ali VCA.	Reaktivacija *
Serološka slika je enaka kot pri reaktivaciji, vendar imamo visoke titre IgA protiteles.	Nazofaringealni karcinom in EBV limfom.
Ni specifičnih IgG, IgM in IgA pasov.	EBV negativno.
Imamo prisoten samo en razred protiteles in samo en določen reakcijski pas.	Ni rezultata testa (priporočeno ponovno testiranje čez 2-3 tedne).

\* Pri reaktivaciji je prišlo do prehoda virusa v litični cikel. Proliferacija ima majhen obseg in ne traja dolgo. Do tega pride, če je oseba pod stresom oz. zaradi drugih okužb. Pri osebah, ki imajo oslabiljen imunski sistem ali prejemajo imunosupresivna zdravila, lahko traja dlje in pride celo do razvoja limfoma.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI CITOMEGALOVIRUSU

Od 1.1.2009 do 31.12.2009 so v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij določili protitelesa proti citomegalovirusu v 2152 serumskih vzorcih. Z diagnostičnim sistemom Liaison so specifična protitelesa CMV IgM dokazali v 171 vzorcih oziroma v 7,9 % pregledanih serumskih vzorcev. Pri izbiri vzorcev za izvedbo diplomske naloge smo se omejili le na vzorce oseb, ki so bile starejše od 13 let, saj smo ocenili, da zanje obstaja večja verjetnost, da so se že srečali z virusom Epstein Barr. V ožji izbor smo tako vključili 136 vzorcev. Pri pregledu demografskih podatkov za 136 izbranih vzorcev smo ugotovili, da so bili nekateri pacienti testirani več kot enkrat, zato smo se pri njih omejili samo na analizo prvega poslanega vzorca. Tako je v analizi ostalo 108 serumov bolnikov, v katerih so bila dokazana protitelesa CMV IgM (Preglednica 7).

Preglednica 7: Preglednica izbora vzorcev, ki vsebujejo specifična protitelesa razreda IgM proti citomegalovirusu.

Število pozitivnih vzorcev (CMV IgM poz.)	136
Število oseb	108

Najprej smo za 108 vzorcev preverili, ali ti vsebujejo tudi protitelesa CMV IgG. Pri 93-ih osebah (86,1 %) smo poleg protiteles CMV IgM zaznali še protitelesa CMV IgG. V štirih vzorcih (3,7 %) je bila določena mejna vrednost protiteles CMV IgG in v 11-ih vzorcih (10,2 %) protitelesa CMV IgG niso bila zaznana (Preglednica 8).

Preglednica 8: Prisotnost protiteles CMV IgG v 108 serumskih vzorcih s protitelesi CMV IgM.

CMV IgG	CMV IgG poz.	CMV IgG m. v.	CMV IgG neg.	Skupaj
CMV IgM poz.	93 (86,1 %)	4 (3,7 %)	11 (10,2 %)	108

V vseh 93 serumskih vzorcih, ki so vsebovali protitelesa CMV IgM in CMV IgG, smo določili avidnost protiteles CMV IgG. Ugotovili smo, da je 45 vzorcev (48,4 %) vsebovalo protitelesa IgG z nizko avidnostjo, osem vzorcev (8,6 %) je imelo srednjo avidnost protiteles CMV IgG in 40 oseb (43,0 %) je vsebovalo protitelesa CMV IgG z visoko avidnostjo. Pri 15 vzorcih, v katerih smo določili mejno vrednost protiteles CMV IgG ali pa specifičnih protiteles razreda IgG sploh niso vsebovala, testa avidnosti nismo mogli izvesti zaradi tehničnih omejitev (Preglednica 9).

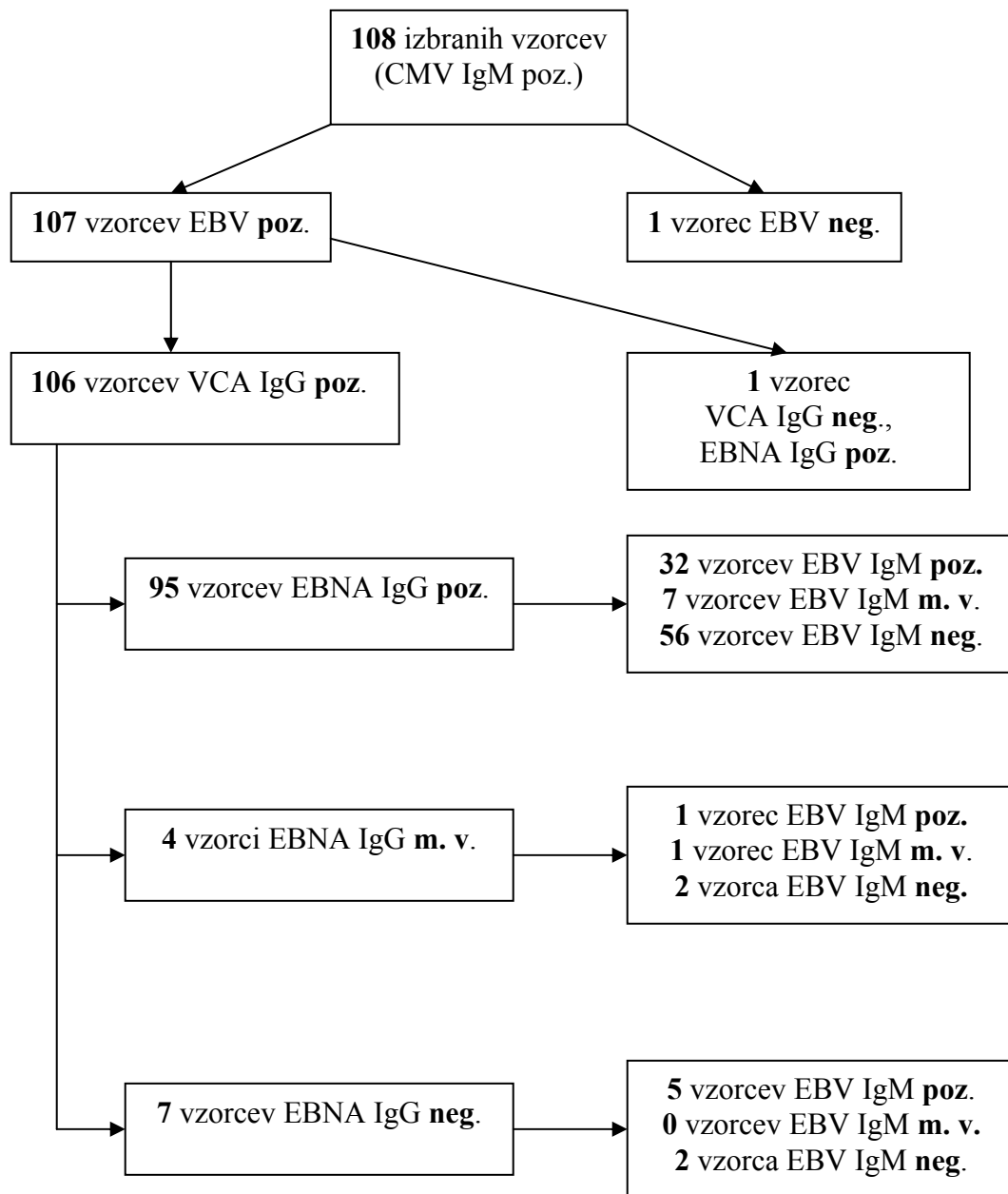
Preglednica 9: Prikaz rezultatov določanja avidnosti protiteles CMV IgG za 93 vzorcev s prisotnimi protitelesi CMV IgM in CMV IgG.

Avidnost	Nizka	Srednja	Visoka	Skupaj
CMV IgG poz.	45 (48,4 %)	8 (8,6 %)	40 (43,0 %)	93

#### 4.2 DOLOČANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EPSTEIN BARR

Vsem 108 vzorcem, ki so bili vključeni v analizo in so imeli dokazana specifična protitelesa IgM proti virusu CMV, smo določili tudi prisotnost protiteles proti virusu EBV.

Ugotovili smo, da je med 108 pregledanimi vzorci 107 (99,1 %) takih, ki vsebujejo protitelesa proti vsaj enemu od antigenov virusa EBV. Pri enem vzrocu smo ugotovili samo protitelesa IgG proti antigenu EBNA in v 106 vzorcih (98,1 %) smo dokazali protitelesa IgG proti antigenu VCA. Med 106 vzroci s protitelesi IgG proti antigenu VCA smo ugotovili 95 takih (89,6 %), ki so imeli tudi protitelesa IgG proti antigenu EBNA, in 38 takih (35,8 %), ki so imeli protitelesa razreda IgM proti antigenom EBV. Protitelesa EA IgG smo zaznali v 14 vzorcih (13,2 %) (Slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v izbranih vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgM.



### 4.3 OPREDELITEV REZULTATOV GLEDE NA STATUS OKUŽBE Z VIRUSOM CMV

Ugotovili smo, da je med 93 vzorci z dokazanimi protitelesi CMV IgM in CMV IgG 37 vzorcev (39,8 %) vsebovalo protitelesa EBV IgM in sedem vzorcev (7,5 %) mejno vrednost protiteles EBV IgM. V preostalih 49-ih serumskih vzorcih (52,7 %) protiteles EBV IgM nismo zaznali.

V serumih, v katerih smo določili protitelesa CMV IgM in mejno vrednost protiteles CMV IgG, nismo ugotovili protiteles EBV IgM. V vzorcih, ki so vsebovali le protitelesa CMV IgM, ne pa tudi protiteles CMV IgG, smo v enem vzorcu (9,1 %) dokazali protitelesa EBV IgM, v dveh (18,1 %) mejno vrednost in v osmih vzorcih (72,7 %) ni bilo zaznavnih protiteles EBV IgM (Preglednica 10).

Preglednica 10: Prisotnost protiteles EBV IgM pri osebah s prisotnimi protitelesi CMV IgG.

CMV IgG / EBV IgM	EBV IgM poz.	EBV IgM m. v.	EBV IgM neg.	Skupaj
CMV IgG poz.	37 (39,8 %)	7 (7,5 %)	49 (52,7 %)	93 (100 %)
CMV IgG m. v.	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4 (100 %)	4 (100 %)
CMV IgG neg.	1 (9,1 %)	2 (18,1 %)	8 (72,7 %)	11 (100 %)
Skupaj	38	9	61	108

V 93 vzorcih s specifičnimi protitelesi razreda IgG proti virusu CMV smo določili avidnost protiteles CMV IgG. V posamezni skupini vzorcev z nizko, srednjo ali visoko avidnostjo protiteles CMV IgG smo nato analizirali prisotnost protiteles razreda IgM proti virusu EBV.

Med 45 vzorci z dokazano nizko avidnostjo protiteles CMV IgG so bila v 23 vzorcih (51,1 %) prisotna protitelesa EBV IgM. V petih vzorcih (11,1 %) smo določili mejno vrednost protiteles in v 17 vzorcih (37,8 %) protiteles EBV IgM ni bilo prisotnih.

V osmih vzorcih, v katerih smo dokazali protitelesa razreda IgG proti virusu CMV s srednjo avidnostjo, smo v štirih serumskih vzorcih (50,0 %) določili protitelesa EBV IgM, v preostalih štirih (50,0 %) pa jih nismo zaznali.

Med 40 vzorci s prisotnimi protitelesi CMV IgG z visoko avidnostjo smo določili v 10 vzorcih (25,0 %) protitelesa EBV IgM, v dveh vzorcih (5,0 %) mejno vrednost in v 28 vzorcih (70,0 %) ni bilo določenih protiteles EBV IgM (Preglednica 11).

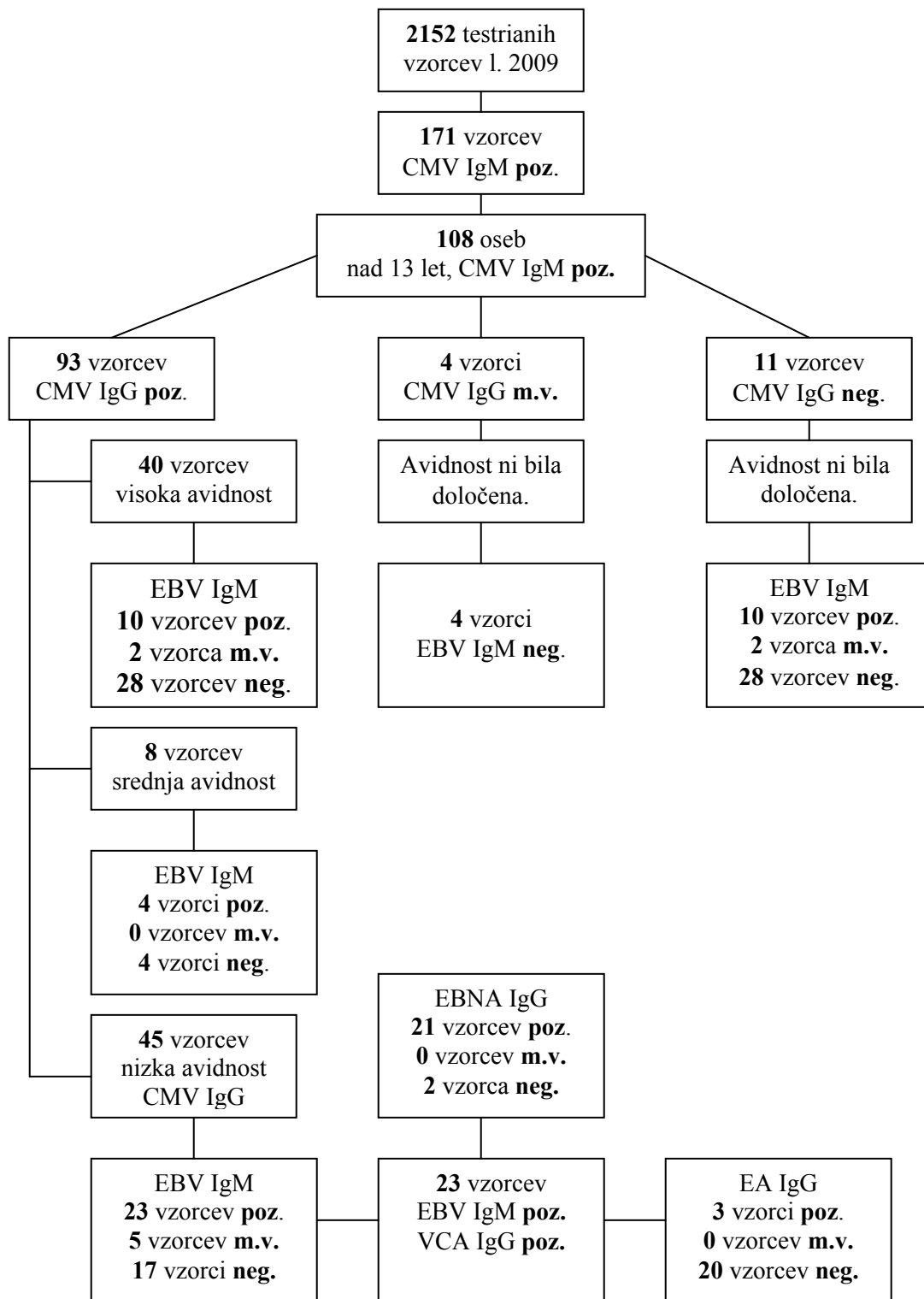
Preglednica 11: Razmerje med osebami z različno avidnostjo protiteles CMV IgG in prisotnostjo protiteles EBV IgM.

	Nizka avidnost	Srednja avidnost	Visoka avidnost	Skupaj
EBV IgM poz.	23 (51,1 %)	4 (50,0 %)	10 (25,0 %)	37
EBV IgM m. V.	5 (11,1 %)	0 (0,0 %)	2 (5,0 %)	7
EBV IgM neg.	17 (37,8 %)	4 (50,0 %)	28 (70,0 %)	49
Skupaj	45 (100 %)	8 (100 %)	40 (100 %)	93

V 23 serumskih vzorcih, v katerih smo dokazali nizko avidnost protiteles CMV IgG in protitelesa EBV IgM, smo določili še protitelesa razreda IgG proti virusu EBV. Ugotovili smo, da so bila protitelesa razreda IgG proti antigenu VCA prisotna v vseh 23 vzorcih. Protitelesa EBNA IgG smo zaznali v 21 vzorcih (91,3 %), v dveh vzorcih (8,7 %) pa smo dobili negativen rezultat (Preglednica 12). Protitelesa EA IgG smo določili v treh vzorcih, v 20 vzorcih pa protiteles EA IgG ni bilo (Slika 4).

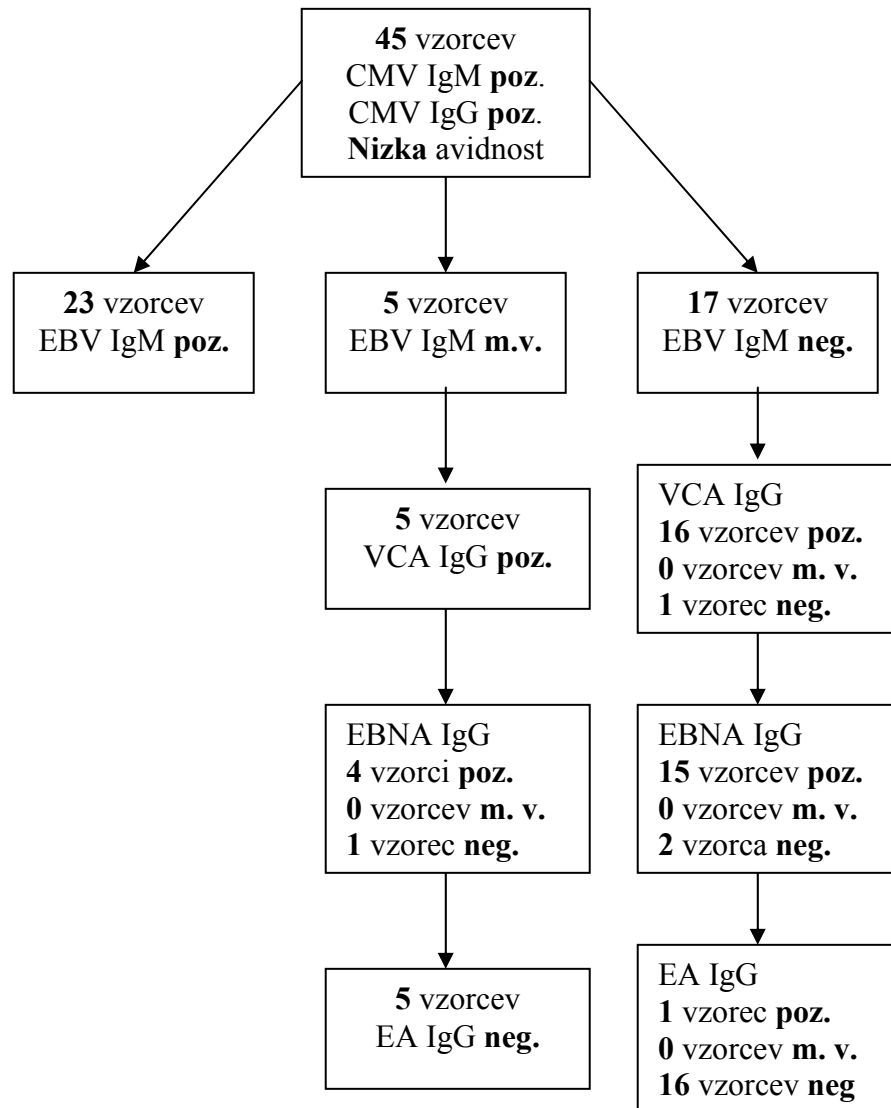
Preglednica 12: Prisotnost protiteles EBNA IgG pri osebah z nizko avidnostjo protiteles CMV IgG in prisotnimi protitelesi EBV IgM in VCA IgG.

	EBNA IgG poz.	EBNA IgG m. v.	EBNA IgG neg.	Skupaj
VCA IgG poz.	21 (91,3 %)	0 (0,0 %)	2 (8,7 %)	23 (100 %)



Slika 4: Shematski prikaz ključnih rezultatov testiranja z diagnostičnim sistemom Liaison.

V petih vzorcih smo dokazali protitelesa CMV IgM, protitelesa CMV IgG z nizko avidnostjo in mejno vrednostjo protiteles EBV IgM. Pri vseh smo določili protitelesa VCA IgG, protitelesa razreda IgG proti antigenu EA pa niso bila zaznavna. V štirih vzorcih (80,0 %) smo zaznali protitelesa EBNA IgG in v enem vzorcu (20,0 %) zgolj mejno vrednost protiteles EBNA IgG (Slika 5).

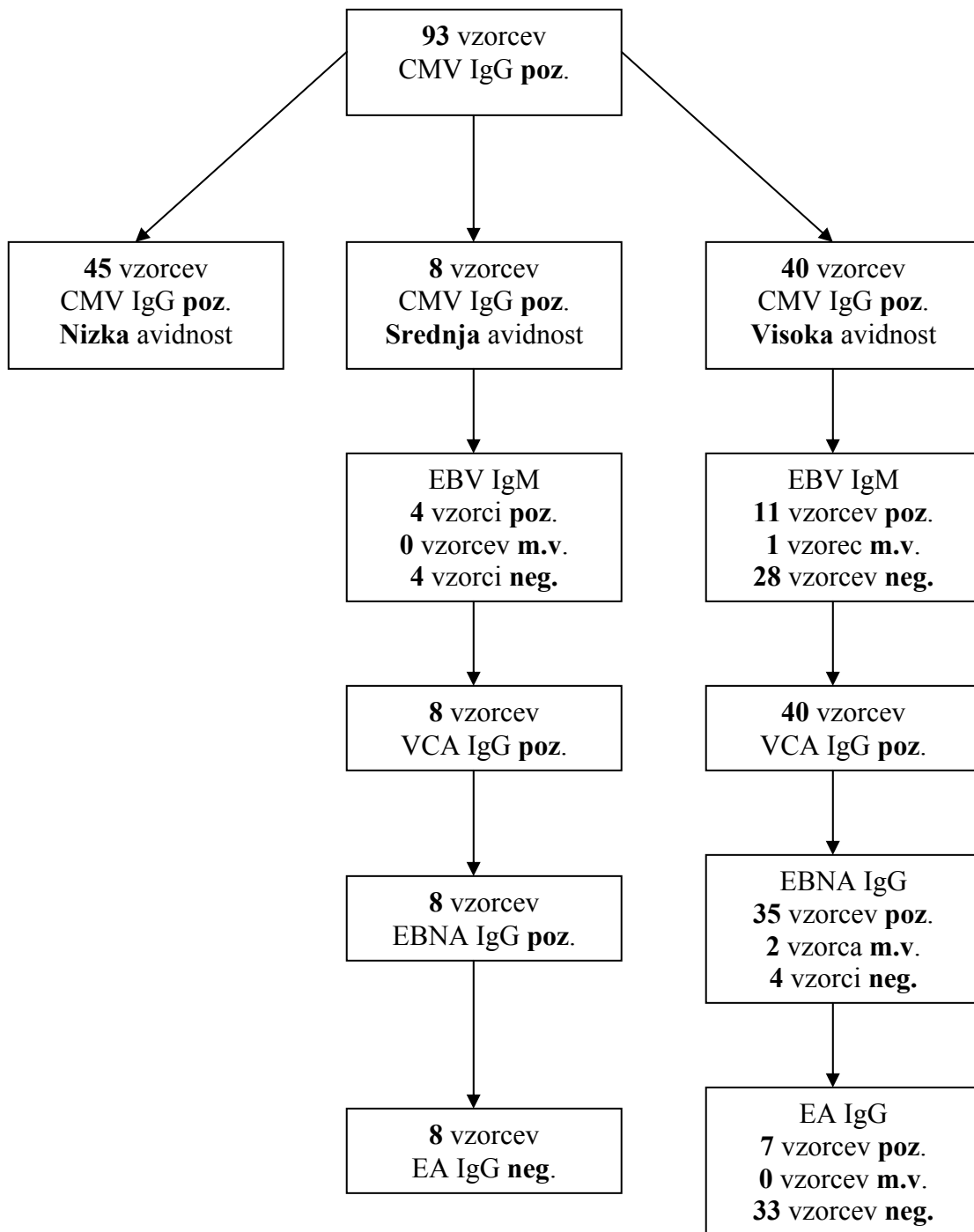


Slika 5: Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgG z nizko avidnostjo.

V 17 vzorcih, v katerih smo določili protitelesa CMV IgM in nizko avidna protitelesa CMV IgG, vendar so bila odsotna protitelesa EBV IgM, smo v 16-ih serumih (94,1 %) zaznali protitelesa VCA IgG. V 15 vzorcih (88,2 %) smo dokazali protitelesa EBNA IgG. Protitelesa razreda IgG proti antigenu EA so bila določena v 1 serumskem vzorcu, v ostalih 16 vzorcih (94,1 %) pa niso bila zaznavna (Slika 5).

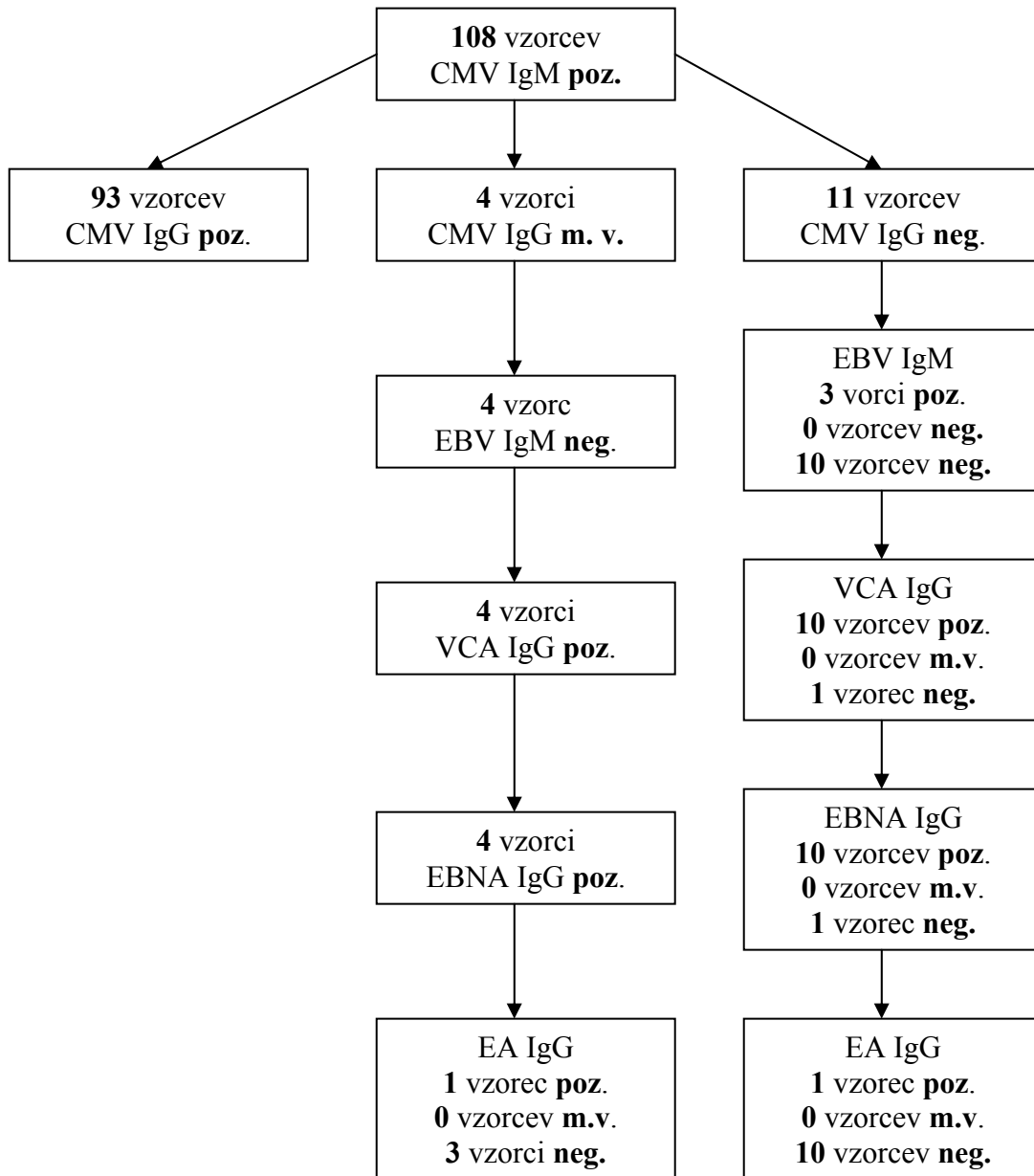
Protitelesa CMV IgG s srednjo avidnostjo, protitelesa VCA IgG in EBNA IgG so bila dokazana v osmih vzorcih. Od tega so bila v štirih vzorcih (50,0 %) prisotna protitelesa EBV IgM in v štirih (50,0 %) so bila pod mejo zaznavnosti. Protiteles razreda IgG proti antigenu EA nismo dokazali v nobenem vzorcu (Slika 6 )

V 40 vzorcih z dokazanimi visoko avidnimi protitelesi CMV IgG smo določili 11 vzorcev (27,5 %) s prisotnimi protitelesi EBV IgM, en vzorec (2,5 %) z mejno vrednostjo in 28 vzorcev (70,0 %) brez zaznavnih protiteles EBV IgM. V vseh serumskih vzorcih smo dokazali protitelesa razreda IgG proti antigenu VCA. Protitelesa EBNA IgG smo določili v 35 serumih (85,0 %), v dveh serumih (5,0 %) smo zaznali mejno vrednost in v štirih serumih (10,0 %) protiteles EBNA IgG nismo določili. V 32 vzorcih (80,0 %) nismo zaznali protiteles EA IgG, v osmih srumih (20,0 %) pa smo dokazali njihovo prisotnost (Slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgG s srednjo in visoko avidnostjo.

Mejno vrednost protiteles CMV IgG smo dokazali v štirih vzorcih, med katerimi v nobenem vzorcu ni bilo prisotnih protiteles EBV IgM. V vseh štirih vzorcih smo določili protitelesa razreda IgG proti antigenoma VCA in EBNA. Protitelesa EA IgG smo dokazali zgolj v enem vzorcu (25,0 %) (Slika 7).



Slika 7: Shematski prikaz rezultatov določanja specifičnih protiteles proti virusu EBV v vzorcih z dokazanimi protitelesi CMV IgM in z mejno vrednostjo protiteles CMV IgG oz. brez protiteles CMV IgG.

Med 11 vzorci, v katerih ni bilo prisotnih protiteles CMV IgG, smo v 1 vzorcu (9,1 %) določili protitelesa EBV IgM in v dveh vzorcih (18,2 %) mejno vrednost. Protitelesa VCA IgG in EBNA IgG smo zaznali v 10 vzorcih (9,9 %) in samo v enem vzorcu (9,1 %) ne. Protitelesa razreda IgG proti antigenu EA smo dokazali samo v enem vzorcu in v desetih vzorcih (90,9 %) je bil rezultat negativen (Slika 7).

#### 4.4 POTRJEVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI VIRUSU EBV

Med 108 serumskimi vzorci, ki so bili vključeni v diplomsko nalogo, smo izbrali 23 vzorcev (21,3 %), v katerih smo dokazali protitelesa CMV IgM, protitelesa CMV IgG z nizko avidnostjo in protitelesa EBV IgM. Vzorci so pripadali devetim ženskam, s povprečno starostjo 25,6 let, in 14 moškim, s povprečno starostjo 33,8 let.

23 vzorcev smo testirali z diagnostičnim sistemom *recomLine* EBV in določili prisotnost protiteles razreda IgM in IgG proti posamičnim antigenom. Vzorec smo označili kot EBV reaktiven, če je bil vsaj en pas enake intenzitete kot mejni barvni pas. Negativen vzorec pa je bil tisti, pri katerem nismo imeli reakcijskih barvnih pasov ali pa so ti imeli šibkejšo intenziteto kot mejni barvni pas. Pri dokončnem določanju EBV statusa pa moramo vedno upoštevati rezultate tako za protitelesa EBV IgG kot za EBV IgM.

##### 4.4.1 Določanja protiteles razreda IgM proti virusu Epstein Barr z metodo imunoblot

S testom imunoblot smo dokazovali protitelesa razreda IgM proti virusu EBV.

Protitelesa VCA IgM smo določali z rekombinantno beljakovino p23 kapsidnega antigena. V petih vzorcih (21,7 %) smo protitelesa VCA IgG dokazali in v 18 vzorcih (78,3 %) protiteles VCA IgM nismo zaznali.



ZEBRA rekombinantna beljakovina je peptidni fragment beljakovine BZLF1, s katerim določamo prisotnost protiteles IEA IgM. Protitelesa IEA IgM smo dokazali v enem vzorcu (4,3 %), v preostalih 22 vzorcih (95,7 %) pa smo dobili negativen rezultat.

Protitelesa EA IgM določamo z uporabo rekombinantnih beljakovin p138 in p54. Protitelesa EA IgM smo z antigenom p138 dokazali v šestih vzorcih (26,1 %) in v 17 vzorcih (73,9 %) protiteles nismo zaznali. Z rekombinantnim antigenom p54 smo določili protitelesa razreda IgM v 19 vzorcih (82,6 %), v preostalih štirih vzorcih (17,4 %) pa protiteles nismo zaznali. Protitelesa EA IgM smo skupno določili v 20 vzorcih (87,0 %), v treh vzorcih (13,0 %) pa niso bila zaznavna (Preglednica 13).

Preglednica 13: Prisotnost protiteles razreda IgM proti virusu EBV določenih z metodo imunoblot.

	VCA (p23)	IEA (ZEBRA)	EA (p138)	EA (p54)
IgM poz.	5 (21,7 %)	1 (4,3 %)	6 (26,1 %)	19 (82,6 %)
IgM neg.	18 (78,3 %)	22 (95,7 %)	17 (73,9 %)	4 (17,4 %)
Skupaj	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)

V nobenem vzorcu niso bila prisotna protitelesa razreda IgM proti vsem testiranim antigenom. V treh vzorcih (13,0 %) nismo zaznali protiteles razreda IgM proti uporabljenim rekombinantnim antigenom virusa EBV. V 14 vzorcih (60,9 %) smo zaznali zgolj protitelesa EA IgM. V enem serumskem vzorcu (4,3 %) smo dokazali samo protitelesa IEA ZEBRA IgM in EA IgM, v petih vzorcih pa le protitelesa VCA IgM in EA IgM.

#### 4.4.2 Določanje protiteles razreda IgG proti virusu Epstein Barr z metodo imunoblot

S testom imunoblot smo dokazovali tudi protitelesa razreda IgG proti virusu EBV.

Povišan titer protitelesa proti reakcijskemu antigenu EBNA-1 najdemo pri pretekli okužbi, pri primarni okužbi pa specifičnih protiteles ne zaznamo. Protitelesa proti antigenu EBNA-1 smo našli v 22 vzorcih (95,7 %), v enem vzorcu (4,3 %) pa protiteles nismo zaznali.

Protitelesa VCA IgG smo dokazovali z rekombinantnima beljakovinama p23 in p18. Protitelesa razreda IgG proti antigenu p23, ki so običajno prisotna pri sveži okužbi, smo določili v vseh vzorcih. Z antigenom p18 pa so reagirala protitelesa iz 22 vzorcev (95,7 %), ki so prisotna le pri pretekli okužbi. Ugotovili smo, da so bila protitelesa VCA IgG skupno dokazana v vseh 23 vzorcih.

Protitelesa IEA IgG, ki so se vezala na rekombinantno beljakovino BZLF1, so bila prisotna v 21 vzorcih (91,3 %). Rekombinantna antigena p138 in p54 smo uporabili za dokazovanje protiteles EA IgG. V sedmih vzorcih (30,4 %) smo zaznali protitelesa proti antigenu p138 in v devetih serumih (39,2 %) smo dokazali protitelesa razreda IgG uperjena proti antigenu p54. Skupno smo v 12 vzorcih (47,8 %) določili protitelesa EA IgG (Preglednica 14).

Preglednica 14: Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG proti različnim antigenom virusa EBV določenih z metodo imunoblot.

	EBNA-1	VCA (p18)	VCA (p23)	IEA(BZLF1)	EA (p138)	EA (p54)
IgG poz.	22 (95,7 %)	23 (100 %)	22 (95,7 %)	21 (91,3 %)	7 (30,4 %)	9 (39,2 %)
IgG neg.	1 (4,3 %)	0 (0,0 %)	1 (4,3 %)	2 (8,7 %)	16 (69,6 %)	14 (60,8 %)
Skupaj	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)	23 (100 %)

Med 23 vzorci smo v 11-ih (47,8 %) dokazali prisotnost protiteles IgG uperjenih proti vsem uporabljenim rekombinantnim beljakovinam. V devetih vzorcih (39,1 %) smo zaznali protitelesa EBNA IgG, VCA IgG in protitelesa proti antigenu BZLF1. V enem serumu (4,3 %) smo dokazali protitelesa razreda IgG proti vsem testiranim antigenom razen protiteles proti

antigenu EBNA-1. V dveh vzorcih (8,7 %) pa smo določili zgolj protitelesa EBNA IgG in VCA IgG. Med testiranimi serumi ni bilo nobenega, ki ne bi imel zaznavnih protiteles razreda IgG.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Uvod

Citomegalovirus (CMV) in virus Epstein Barr (EBV) uvrščamo v družino *Herpesviridae*, ki so razmeroma veliki in kompleksni DNA virusi. Z njima je trajno okužena večina svetovne populacije in ne povzročata epidemij. Oba virusa se lahko prenašata s slino, poleg tega pa lahko pride do okužbe z virusom CMV preko ostalih telesnih tekočin, kot so urin, kri, semenska in vaginalna tekočina. Pri večini imunsko kompetentnih oseb, ki pridejo v stik z virusom, se pojavlja asimptomatska okužba, lahko pa pride do razvoja resnejše klinične slike (Hodinka, 1999; Lennete, 1999).

Okužba z virusom CMV se lahko kaže kot infekcijska mononukleoza, ki največkrat poteka kot blago bolezensko stanje. Okužbe oseb, ki imajo presajen organ, ali oseb, ki imajo oslabilen imunski sistem, pa lahko vodijo v zavračanje presadka, splenomegalijo, pljučnico, hemolitično anemijo, miokarditis, encefalitis in druge zaplete, ki so lahko za bolnika smrtni (Hodinka, 1998). Kongenitalne okužbe z virusom CMV so zelo nevarne za plod in spadajo med najpogostejše kongenitalne okužbe na sploh. Posledice tovrstne okužbe so lahko omejene, pri nekaterih pa ostanejo trajne poškodbe (npr.: nepravilno delovanje ledvic, trebušne slinavke in pljuč, izguba sluha in/ali vida, poškodbe možganov). Postnatalne okužbe so bistveno manj nevarne (CDC, 2010).

Okužbe z virusom CMV laboratorijsko dokazujemo neposredno z metodo osamitve virusa v celični kulturi po sistemu »*Shell vial*« ali z dokazom virusne DNA z verižno reakcijo polimeraze. Posredno okužbe s CMV dokazujemo z ugotavljanjem prisotnosti specifičnih protiteles IgM in IgG ter določanjem avidnosti protiteles IgG (Hodinka, 1999). Za zdravljenje okužb je namenjen ganciklovir, ki pa ima omejeno uporabo, zlasti pri nosečnicah in otrocih, zaradi stranskih učinkov (Koren in Poljak, 2005). Cepivo še ni na voljo, zato je ključno

določanje imunskega statusa in izogibanje stikom z okuženimi otroci ter uporaba kondomov (CDC, 2010).

Okužba z virusom EBV se najpogosteje izraža kot infekcijska mononukleoza in je po klinični sliki podobna infekcijski mononukleози, povzročeni z virusom CMV. Po okužbi ostane virus EBV v telesu v latentni obliki. EBV je vpleten tudi v nastanek malignih bolezni kot so Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom in PTLD, t.i. post-transplantacijska limfoproliferativna bolezen (Cohen, 1998). Potek bolezni je odvisen od starosti bolnika in njegovega predhodnega zdravstvenega stanja. Diagnozo laboratorijsko potrdimo na podlagi krvnega razmaza, kjer iščemo atipične limfocite, z dokazovanjem heterofilnih protiteles ali pa specifičnih protiteles VCA IgM oz. EBV IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG. Pri imunsko oslabljenih bolnikih in malignih boleznih dokazujemo virusno DNA z verižno reakcijo polimeraze (Cohen, 1998).

Poseben problem predstavljajo pri vseh virusih družine *Herpesviridae* reaktivacije virusa iz latentnega stanja. Reaktivacije so po okužbi z virusoma CMV in EBV zelo pogoste. Najpogosteje potekajo v obliki asimptomatske replikacije in izločanja virusa.

Študija je nakazala resno problematiko testiranja, saj je z rutinskimi testi velikokrat določena okužba z virusom EBV namesto primarne okužbe z virusom CMV. Posledice te napake so lahko hude pri nosečnicah ali pri imunsko oslabljenih osebah, zato bi morali izboljšati način testiranja bolnikov (Aalto in sod., 1998).

V reviji *Infection* je bila objavljena klinična in epidemološka študija o laboratorijskih kazalcih in kliničnem vidiku pri primarni okužbi s citomegalovirusom (Just-Nübling in sod., 2003). Vključevala je bolnike, ki so kazali vročinsko stanje s pridruženim hepatitisom in s potrjeno primarno okužbo z virusom CMV, ki so jo potrdili s pozitivnim testom za protitelesa CMV IgM oz. s serokonverzijo protiteles CMV IgG. Več kot polovico oseb (15 od 22 bolnikov) so dodatno testirali še na prisotnost protiteles proti virusu Epstein Barr, saj lahko infekcijsko

mononukleozo povzročata oba virusa. Ugotovili so, da bi za postavitev prave diagnoze vedno morali opraviti serološke teste za določanje protiteles proti virusu CMV in EBV. Pogosto se namreč lahko zgodi, da dobimo šibko pozitivne oz. nespecifične rezultate testov za protitelesa razreda IgM proti virusu EBV pri bolnikih, ki imajo neznačilno klinično sliko, vključno s svežo okužbo s citomegalovirusom. To bi lahko pripisali reaktivaciji virusa EBV, ki jo je vzbudila akutna okužba z virusom CMV, vendar bi lahko tudi pri bolnikih z akutno okužbo z virusom EBV opazili navzkrižno reaktivnost s protitelesi proti virusu CMV, kar otežuje diagnosticiranje. Potrebno bi bilo določanje anti-EBNA-1, da ne bi napačno predpostavili vrste okužbe (npr. primarna okužba z virusom EBV), in določanje protiteles proti rekombinantnim antigenom, kot je na primer CMV glikoprotein B, ki je uporabljen v nekaterih encimsko-immunskih testih (Just-Nübling in sod., 2003).

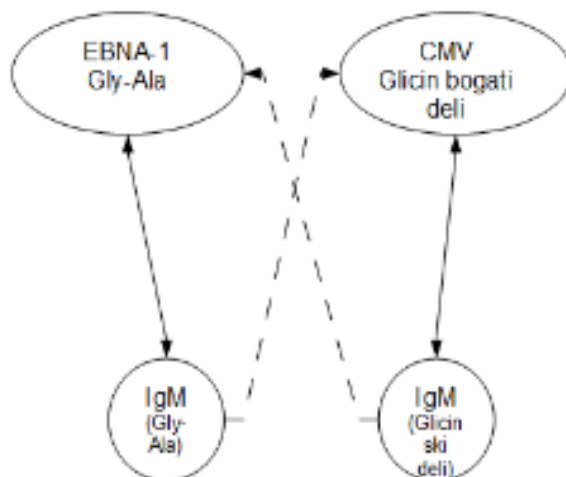
V študiji, ki so jo objavili Linde in sodelavci, so ugotovili, da so lahko visoke vrednosti protiteles proti različnim virusom med in po primarni okužbi z virusom Epstein Barr rezultat aktivacije poliklonskih B celic (Linde in sod., 1999). Slednje pa naj ne bi bilo nujno posledica samega delovanja virusa EBV. Produkcija limfokinov, ki jo vzbudi okužba, lahko stimulira celice B in tako nastane več protiteles razreda IgG. Ne moremo niti izključiti možnosti, da pride med okužbo z virusom EBV do reaktivacije virusa CMV kot tudi do humanega herpes virusa 6 (HHV-6) ali do stimulacije spominskih B celic s sorodnimi antigeni. Slednje naj bi potrdilo dejstvo, da pride do vzporednega povečanja titra protiteles tudi proti virusu ošpic, iz rodu morbilivirusov, ki ni latenten virus. Prisotnost protiteles proti virusu EBV oz. celičnih protiteles, ki navzkrižno reagirajo z epitopi, pa so kljub vsemu ovrgli, saj je tudi po adsorbnciji protiteles proti virusu EBV ostal titer heterolognih protiteles razreda IgG nespremenjen (Linde in sod., 1999).

Virus EBV je znan kot nespecifičen imunski stimulator. V *in vitro* študijah so dokazali, da lahko nespecifični dejavniki povzročijo povečano produkcijo protiteles proti heterolognim virusom. Mogoče je potrebno spodbujanje spominskih celic B z različnimi agensi, kar omogoči proizvodnjo specifičnih protiteles vse življenje (Linde in sod., 1999).

Leta 2001 je bila objavljena raziskava o navzkrižni reaktivnosti specifičnih protiteles EBV IgM in antigenov citomegalovirusa (Lang in sod., 2001). Določanje okužbe z virusom CMV največkrat temelji na določanju protiteles razreda IgM z metodo ELISA, mikroaglutinacijo in testom imunoblot. Ključna težava pri tem je vključitev ustreznih beljakovin, ki reagirajo z iskanimi protitelesi. S podobnim problemom so se soočali tudi pri določanju okužbe z virusom EBV in CMV, saj so bile določene DNA in beljakovinske homologije v ohranjenih genih. Zato so uvedli rekombinantne beljakovine, kar pa še vedno ne izključuje reaktivnosti z majhnimi epitopi znotraj nehomolognih beljakovin. Določili so prisotnost protiteles razreda IgM, ki reagirajo z delom Gly-Ala ponovitev v beljakovini EBNA-1 med akutno okužbo z virusom EBV ali CMV (Lang in sod., 2001).

Posvetili so se preučevanju, ali protitelesa IgM, ki so specifična za Gly-Ala ponovitve znotraj beljakovine EBNA-1, reagirajo z beljakovinskimi antigeni, ki so v uporabi pri seroloških preiskavah pri določanju okužbe s citomegalovirusom (Lang in sod., 2001). Predpostavili so, da manjši odseki družine beljakovin UL112-113 CMV, bogati z glicinom, lahko reagirajo z Gly-Ala specifičnimi protitelesi IgM. Med tovrstne beljakovine, ki so v vključene kot antigeni v rutinske teste ELISA in aglutinacijske teste za virus CMV, sta najpogostejša pUL44 in pUL57, ki pa nista vedno prisotna v enaki količini, kar je posledica pridobivanja antigenov iz celičnih kultur. Ti dve rekombinantni beljakovini naj bi reagirali s protitelesi razreda IgM med okužbo z virusom EBV, kar naj bi nakazovalo na ozko usmerjeno reaktivnost z antigeni EBV. Okužba z virusom EBV naj bi torej spodbudila nastanek protiteles IgM, ki reagirajo z glicinom obogatenimi odseki, kar lahko vpliva na napačno razlago rezultatov, če ne opravimo testov za določanje protiteles proti obema virusoma. Med okužbo z virusom CMV pa naj bi ta zaporedja inducirala nastanek protiteles IgM, ki lahko reagirajo tako z Gly-Ala ponovitvami kot z glicinom bogatimi predeli v pUL57 (Slika 8). Če pa so z glicinom bogat predel odstranili iz rekombinantne beljakovine in s tem tudi ključne epitope, antigen ni bil več uporaben za testiranje protiteles proti virusu CMV, prav tako pa sta se zmanjšali specifičnost in občutljivost, če so odstranili antigena pUL57 ali pUL44. Nadomestili bi ju lahko z drugim,

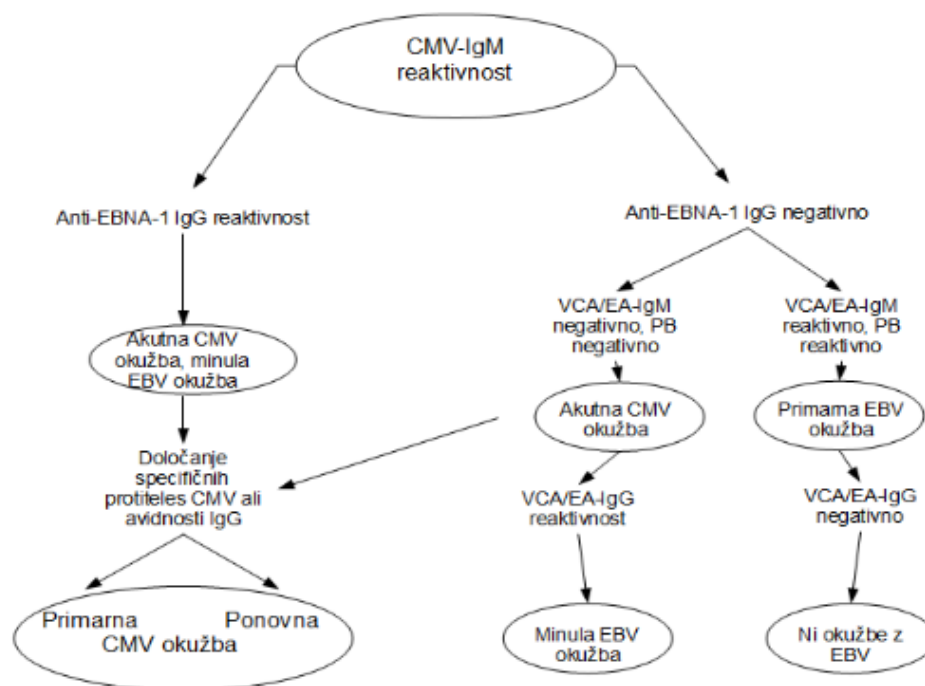
beljakovinami, vendar bi lahko bila specifičnost še vedno prenizka ali pa bi ravno tako vsebovale z glicinom bogata zaporedja (Lang in sod., 2001).



Slika 8: Shematska ponazoritev, kako v EBNA-1 Gly-Ala ponovitve in z glicinom obogateni odseki antigenov CMV spodbudijo nastajanje protiteles IgM med okužbo z virusom CMV ali EBV (Lang in sod., 2001).

Gly-Ala specifična protitelesa IgM, ki lahko navzkrižno reagirajo z avtoantigeni, so morebiti tudi del širše imunske zaščite (Lang in sod., 2001). Da bi se izognili napačnim opredelitvam, bi bilo priporočljivo, da bi vse serume, v katerih so zaznana protitelesa CMV IgM, testirali še na prisotnost protiteles EBNA IgG. V primeru prisotnosti IgG EBNA in CMV IgM takšna konstelacija rezultatov nakazuje minulo okužbo z virusom EBV in akutno okužbo z virusom CMV. Slednjo pa je priporočljivo potrditi z določitvijo specifičnih protiteles razreda IgG in nizke avidnosti. Prav tako lahko predpostavimo, da je prišlo do akutne okužbe z virusom CMV, če nimamo specifičnih protiteles EBV IgM in je test s Paul-Bunellovim antigenom negativen. Slika 9 prikazuje, kako lahko ločimo primarno ali ponovno okužbo z virusom CMV, preteklo okužbo z virusom EBV ali pa ugotovimo, da sploh še ni prišlo do okužbe z virusom EBV (Slika 9).





Slika 9: Shematska ponazoritev, kako lahko z določanjem specifičnih protiteles s testom s Paul-Bunnellovim antigenom in določanjem avidnosti ločimo med okužbo z virusom CMV in virusom EBV (Lang in sod., 2001).

Pri osebah, ki so imele potrjeno akutno okužbo z virusom Epstein Barr in prisotna protitelesa razreda IgG proti citomegalovirusu, so poročali o lažno pozitivnih rezultatih za protitelesa CMV IgM (Deyi in sod., 2000). Tovrstno reaktivnost so potrdili pri nekaterih encimsko-immunskih testih, ki so v rutinski uporabi. Sočasne okužbe z virusom CMV in EBV sicer ne moremo popolnoma izključiti, čeprav je ta izredno redka. Prav tako pa niso našli dokaza, da bi prišlo do reaktivacije latentnega virusa CMV zaradi akutne okužbe z virusom EBV. Kot veliko bolj verjetno razlago so predstavili aktivacijo poliklonskih B celic, ki reagirajo s heterolognimi antigeni (Deyi in sod., 2000).

### 5.1.2 Analiza Rezultatov

V diplomski nalogi smo uporabili dve različni diagnostični metodi za določanje protiteles v serumskih vzorcih. Najprej smo prisotnost specifičnih protiteles proti citomegalovirusu in

virusu Epstein Barr določili z metodo Liaison. Nato smo izbrane vzorce testirali še z diagnostično metodo *recomLine* in dokazovali prisotnost specifičnih protiteles proti virusu EBV. Predvideli smo, da se je večina odraslih oseb že okužila z virusom EBV, zato smo pričakovali, da bodo rezultati testiranja pokazali, da prebolevajo osebe akutno okužbo z virusom CMV in imajo minulo okužbo z virusom EBV.

V prvem delu raziskave smo najprej naredili izbor vzorcev serumov izmed tistih, v katerih so v letu 2009 v Laboratoriju za diagnostiko virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani določali prisotnost specifičnih protiteles proti virusu CMV. Vključili smo 108 vzorcev, v katerih so bila dokazana protitelesa razreda IgM proti virusu CMV. V vseh izbranih vzorcih smo določili prisotnost protiteles CMV IgM in CMV IgG ter avidnosti protiteles CMV IgG. Ugotovili smo, da je bilo med 108 vzorci z dokazanimi protitelesi CMV IgM 11 vzorcev (10,2 %), v katerih nismo zaznali protiteles CMV IgG in nismo določili avidnosti zaradi tehničnih omejitev. Na podlagi tega rezultata bi lahko zaključili, da je imelo 11 oseb akutno okužbo z virusom CMV v zgodnji fazi, ko specifična protitelesa še niso prisotna.

V serumskih vzorcih, v katerih smo dokazali samo protitelesa CMV IgM, smo nato določili še prisotnost protiteles proti virusu EBV. Ugotovili smo, da ima ena oseba (9,1 %) akutno okužbo z virusom EBV, saj je imela dokazan protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EA IgG. V sedmih vzorcih (63,3 %) smo zaznali protitelesa VCA IgG in EBNA IgG, kar nakazuje na preteklo okužbo. Pri dveh osebah (18,2 %) smo predpostavili, da je prišlo do reaktivacije virusa EBV, ker so bila dokazana protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EBNA IgG. V enem vzorcu (9,1 %) smo določili samo protitelesa razreda IgG proti antigenu EBNA, ki jih dokažemo samo pri pretekli okužbi.

Pri osebi z akutno okužbo z virusom EBV in CMV, bi morali po priporočilih opraviti dodatne diagnostične teste. Razlog za to je namreč naraščujoče število znastvenih poročil o posameznih primerih, ko je prišlo do lažno pozitivnih rezultatov za protitelesa CMV IgM pri

bolnikih s potrjeno akutno okužbo z virusom EBV (Deyi in sod., 2000; Park in sod., 2009). Do tega bi lahko prišlo zaradi istočasne okužbe z virusoma CMV in EBV, reaktivacije virusa EBV in CMV zaradi zaviranja imunskega odziva ali zaradi navzkrižne reaktivnosti med virusnimi antigeni. Kot rešitev so pri tem predlagali, da bi pri osebah z akutno okužbo z virusom EBV in prisotnimi protitelesi CMV IgM potrdili okužbo z virusom CMV še z drugimi metodami, kot so PCR, določanje DNA in ugotavljanje serokonverzije protiteles proti virusu CMV.

V vzorcu, kjer smo določili protitelesa CMV IgM in EBNA IgG, smo morebiti zaznali napačna protitelesa. Pri osebah, ki kažejo simptome infekcijske mononukleoze, moramo biti pazljivi pri interpretaciji rezultatov, saj naj bi protitelesa CMV IgM navzkrižno reagirala z beljakovino EBNA-1. Glede na specifičnost uporabljenih diagnostičnih testov odstotek tovrstnih lažno pozitivnih rezultatov niha med 20,4 in 40,9 % (Lang in sod., 2001).

Med 108 vzorci so bila v štirih vzorcih (3,7 %) prisotna protitelesa CMV IgM in protitelesa CMV IgG z mejno vrednostjo. Testa avidnosti nismo naredili, zato nismo natančno opredelili, kakšna je bila vrsta okužbe s citomegalovirusom. Lahko bi bila sveža okužba in so protitelesa CMV IgG ravno začela nastajati ali pa je bila okužba stara, vendar protitelesa razreda IgG še niso popolnoma dozorela (Hodinka, 1999). Pri imunsko oslabeledih osebah lahko pride do reaktivacije in ponovno pričnejo nastajati protitelesa razreda IgM proti virusu CMV (CDC, 2010).

Vsem štirim osebam smo določili še protitelesa proti virusu EBV in ugotovili pri treh osebah (75,0 %) preteklo okužbo, ker so v serumskih vzorcih imele dokazana protitelesa VCA IgG in EBNA IgG. Pri enem bolniku smo v vzorcu zaznali protitelesa razreda IgG proti antigenom VCA, EBNA in EA. Protitelesa EA IgG so prisotna pri akutni okužbi in občasno pri reaktivaciji. Nekaj mesecev po primarni okužbi naj bi padla pod mejo zaznavnosti. Obstajajo pa tudi izjeme, ko ostanejo protitelesa EA IgG še dolgo prisotna v serumu. Določanje specifičnih protiteles IgG proti antigenu EA tako ne pripomore k postavitvi diagnoze (Hess, 2004). Zato

menim, da bi lahko v tem primeru bila ustrezna diagnoza pretekla okužba z virusom EBV. Vse štiri osebe z dokazanimi protitelesi CMV IgM in mejno vrednostjo protiteles CMV IgG, so torej imele potrjeno preteklo okužbo z virusom EBV.

V vzorcih s prisotnimi protitelesi CMV IgM in CMV IgG smo opravili test avidnosti in jih na podlagi tega razdelili v tri skupine – skupino z nizko, srednjo in visoko avidnostjo protiteles CMV IgG.

Za osebe, ki so imele v vzorcih dokazana protitelesa CMV IgG z visoko avidnostjo, lahko trdimo, da niso prebolevale akutne okužbe s citomegalovirusom in so prišle z njim v stik pred več kot tremi meseci. Med izbranimi 108 vzorci je bilo 40 bolnikov (37,0 %), ki so imeli preteklo okužbo z virusom CMV.

V serumskih vzorcih 40 oseb s preteklo okužbo z virusom CMV smo določili še prisotnost protiteles proti virusu EBV. Ugotovili smo, da so štiri osebe (10,0 %) prebolevale akutno okužbo z virusom EBV. Med njihovimi vzorci smo v enem serumu dokazali protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EA IgG. V dveh vzorcih so bila prisotna protitelesa VCA IgG in pozitiven oz. mejno pozitiven rezultat za protitelesa EBV IgM. V enem vzorcu smo poleg običajno prisotnih protiteles pri sveži okužbi še zaznali mejno vrednost protiteles EBNA IgG, ki so pokazatelj minule okužbe. Ker je morebiti prišlo do lažno pozitivnega rezultata zaradi vpliva protiteles CMV IgM, smo ga kljub vsemu uvrstili v skupino oseb z akutno okužbo (Lang in sod., 2001). Lahko pa so protitelesa IgG proti antigenu EBNA ravno začela nastajati, čeprav je oseba imela primarno okužbo (Hess, 2004).

Pri 22 oseb (55,0 %) smo ugotovili preteklo okužbo z virusom EBV, ker so bila prisotna protitelesa VCA IgG in EBNA IgG. V petih serumih (12,5 %) smo zaznali protitelesa VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG, kar nas spet napeljuje na možnost, da so bila dokazana trajna protitelesa EA IgG in da imajo osebe preteklo okužbo (Hess, 2004). Skupno je bilo 27 oseb z določeno preteklo okužbo (67,5 %) z virusom EBV. V osmih vzorcih (20,0 %) smo dokazali

protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EBNA IgG. Pri osebah s takšnim serološkim profilom je prišlo do reaktivacije. V enem vzorcu smo določili zgolj prisotnost protiteles VCA IgG, kar bi lahko pomenilo, da ima oseba primarno okužbo ali pa je prišlo do lažno pozitivnega rezultata (Hess, 2004). Če pa upoštevamo shematsko ponazoritev (Lang in sod., 2001), bi lahko predvidevali, da je imela oseba z dokazanimi protitelesi CMV IgM in VCA IgG akutno okužbo z virusom CMV in preteklo okužbo z virusom EBV. Vedno, ko imamo dokazana protitelesa samo proti enemu virusnemu antigenu, je priporočljivo, da ponovno vzamemo serumski vzorec in opravimo ustrezna testiranja ali pa naredimo še test na Paul-Bunnellov antigen, test avidnosti za protitelesa razreda IgG, PCR ali test imunoblot.

Med 108 vzorci so bila v osmih vzorcih (7,4 %) dokazana protitelesa CMV IgG s srednjo avidnostjo, ki so lahko prisotna tako pri akutni kot pri pretekli okužbi, če še niso povsem dozorela (Hodinka, 1999). Štiri osebe so imele v serumskem vzorcu prisotna protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EBNA IgG, zato lahko zanje trdimo, da je prišlo do reaktivacije virusa. Preostale štiri osebe so imele preteklo okužbo z virusom EBV, ker so bila v vzorcih dokazana protitelesa VCA IgG in EBNA IgG.

Če določimo nizko avidnost protiteles CMV IgG, lahko predpostavimo, da se je oseba okužila največ tri mesece pred odvzemom vzorca seruma. V naši raziskavi smo imeli 45 vzorcev (41,6 %) s protitelesi CMV IgM in nizko avidnimi protitelesi CMV IgG. Bolnikom s takšno serološko sliko lahko postavimo diagnozo akutne oziroma sveže okužbe s citomegalovirusom. Pri tem pa moramo biti kljub vsemu pazljivi, saj se lahko v določenih primerih razvijejo trajno prisotna protitelesa CMV IgG z nizko avidnostjo in zato ne moremo ločiti med svežo okužbo in reaktivacijo (Hodinka, 1999).

Kot v ostalih vzorcih smo tudi v teh 45 serumih določili specifična protitelesa proti virusu Epstein Barr. Pri eni osebi niso bila zaznavna protitelesa proti EBV, kar pomeni, da oseba še ni prišla v stik z virusom EBV oz. je bil serum odvzet prekmalu po okužbi, ko protitelesa še niso nastala. Dve osebi (4,4 %) naj bi imeli akutno okužbo z virusom EBV, ker sta v vzorcih

imeli prisotna protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EA IgG. To bi lahko pomenilo, da je prišlo do sočasne okužbe z virusom EBV in s CMV, kar je redkost

22 bolnikom (48,9 %) smo v serumskih vzorcih dokazali protitelesa EBV IgM, VCA IgG in EBNA IgG, kar nakazuje na reaktivacijo virusa. Vendar moramo biti pri pojasnjevanju takšnih rezultatov previdni, ker obstaja možnost, da imamo prisotna trajna protitelesa EBV IgM. Posledično ne moremo ločiti med reaktivacijo virusa in preteklo okužbo (Lennete, 1999). Nekateri priporočajo v tovrstnih primerih določanje reaktivnosti beljakovine ZEBRA, ki naj bi ločila prehod virusa iz latentnega v aktivno stanje. To pa ni najbolj zanesljiv pristop, saj so protitelesa ZEBRA IgG dokazali v serumskih vzorcih oseb z infekcijsko mononukleozo in nazofaringealnim karcinomom (Aalto in sod. 1998). Med 22 vzorci smo v dveh vzorcih zaznali poleg protiteles EBV IgM, VCA IgG in EBNA IgG še protitelesa EA IgG, ki naj bi izginila po treh do šestih mesecih po okužbi. Domnevamo lahko, da so slednja protitelesa ostala prisotna dlje, kot je običajno, ali pa so začela nastajati zaradi reaktivacije virusa EBV (Hess, 2004). V 18 vzorcih (40,0 %) smo določili protitelesa razreda IgG proti antigenoma VCA in EBNA, v enem vzorcu pa so bila prisotna protitelesa VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG, ki so bila najverjetneje perzistentna. Predvidevali smo, da naj bi imeli skupno 19 primerov (42,2 %) pretekle okužbe z virusom EBV. V enem vzorcu seruma (2,2 %) so bila dokazana samo protitelesa VCA IgG, kar lahko pomeni akutno ali pa preteklo okužbo z virusom EBV (Lang in sod., 2001; Hess, 2004).

Z metodo Liaison smo določili 40 osebam (37,0 %) preteklo okužbo s citomegalovirusom. Pri 68 oseb (63,0 %) pa imamo mogoče različne razlage rezultatov. Prva možnost je, da je imelo vseh 68 oseb akutno okužbo. V drugi razlagi pa smo upoštevali, da v štirih vzorcih nismo določili avidnosti protiteles CMV IgG zaradi prenizke koncentracije protiteles razreda IgG in da smo v osmih vzorcih imeli prisotna protitelesa CMV IgM s srednjo avidnostjo. Tako smo določili 56 bolnikov (51,9 %) z akutno okužbo, pri 12 oseb (11,1 %) pa je prišlo do reaktivacije.

Glede na določena protitelesa proti virusu Epstein Barr pa smo ugotovili, da ena oseba (1,0 %) ni imela zaznavnih protiteles proti virusu EBV in sedem bolnikov (6,5 %) je prebolevalo akutno okužbo. Pri 36 oseb (33,3 %) je prišlo do reaktivacije in 61 oseb (56,5 %) je imelo preteklo okužbo. V enem vzorcu (1,0 %) smo določili samo protitelesa EBNA IgG in v dveh vzorcih (1,8 %) samo protitelesa VCA IgG. Pri osebah s takšnim serološkim profilom nismo mogli natančno opredeliti stopnje okužbe, ker smo imeli premalo podatkov. Ugotovili smo, da je bilo v naši skupini preiskovancev skupno 88 % takih, ki so imeli ob sumu na akutno okužbo z virusom CMV serološki status skladen s prebolelo okužbo z virusom EBV.

V drugem delu diplomske naloge smo uporabili diagnostično metodo *recomLine* EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM, s katerim smo hoteli preveriti predhodno določene rezultate. Testirali smo 23 serumov oseb z dokazanimi protitelesi CMV IgM, CMV IgG z nizko avidnostjo in protitelesi EBV IgM. Na podlagi rezultatov, ki smo jih pridobili s to metodo, smo ugotovili, da tri osebe v serumskih vzorcih niso imele dokazanih protiteles razreda IgM. Ker so imele hkrati določena protitelesa IgG proti antigenu EBNA-1 in/ali p18, zaznana protitelesa razreda IgG proti rekombinantnima beljakovinama p23 in BZLF1 ter šibak titer protiteles EA IgG, smo predpostavili, da gre pri njih za preteklo okužbo z virusom Epstein Barr. Pri 20 oseb smo je prišlo do sekundarne reaktivacije. V njihovih vzorcih smo določili protitelesa IgG kot pri pretekli okužbi, le da je bila prisotna še reaktivnost protiteles razreda IgG na antigene EA, in šibko reaktivnost protiteles razreda IgM z rekombinantnimi beljakovinami EA in/ali ZEBRA in/ali p23. Možnost primarne okužbe smo pri vseh vzorcih izključili takoj, ko smo ugotovili prisotnost protiteles EBNA IgG. Pri eni osebi, pri kateri v serumu ni bilo dokazanih protiteles IgG proti antigenu EBNA-1, se protitelesa morebiti niso razvila ali pa so izginila. Preteklo okužbo smo vseeno potrdili, ker so bila določena protitelesa IgG proti rekombinantni beljakovini VCA p18.

Izmed 23 vzorcev, ki so bili testirani z obema metodama, smo v enem vzorcu (4,3 %) določili protitelesa EBNA IgG s testom imunoblot, ki so bila pri metodi Liaison pod mejo zaznavnosti. V devetih vzorcih (39,1 %) smo določili reaktivnost protiteles razreda IgG na antigene EA

p138 in EA p54, med tem ko smo z metodo Liaisonom določili negativen rezultat za protitelesa EA IgG. V treh serumih (13,0 %) pa prisotnosti protiteles IgM proti virusu EBV nismo potrdili, čeprav so bila prvotno dokazana.

Zaradi razhajanja v rezultatih obeh metod je prišlo tudi do sprememb v končni interpretaciji. Najprej smo med 23 izbranimi vzorci pri 21 osebah (91,3 %) predpostavili, da je prišlo do reaktivacije, dve osebi (8,7 %) pa naj bi imeli svežo okužbo. Pri osebah, pri katerih smo prvotno določili aktivno okužbo, smo s testom imunoblot zaznali dodatna protitelesa, ki nakazujejo na reaktivacijo. To pomeni, da smo izključili možnost sočasne okužbe z obema virusoma. Med 21 osebami, ki smo jim na podlagi rezultatov sistema Liaison postavili diagnozo reaktivacije, se je pri treh osebah spremenila v minulo okužbo, saj protitelesa razreda IgM proti virusu EBV niso bila zaznavna.

## 5.2 SKLEPI

- V opazovanem letu 2009 so v Laboratoriju za določanje virusnih okužb na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani med 2152 preiskanimi serumskimi vzorci za določanje protiteles proti virusu CMV odkrili 108 oseb z dokazanimi protitelesi razreda IgM proti virusu CMV, ki kažejo na akutno okužbo s citomegalovirusom.
- Med 108 vzorci, ki so vsebovali specifična protitelesa razreda IgM proti virusu CMV, smo določili 93 vzorcev (86,1 %), ki so hkrati vsebovali tudi specifična protitelesa razreda IgG proti virusu CMV.
- 93 vzorcem, ki so vsebovali protitelesa CMV IgM in CMV IgG, smo določili avidnost protiteles CMV IgG in ugotovili, da je imelo nizko avidnost protiteles CMV IgG kot potrditev akutne okužbe 45 bolnikov.
- Z določitvijo specifičnih protiteles proti virusu EBV smo ugotovili, da je imela večina oseb (107 oseb; 99,1 %) tudi protitelesa proti vsaj enemu antigenu virusa EBV.
- Med 40 vzorci z visoko avidnimi protitelesi CMV IgM smo določili 10 vzorcev (25 %), ki so vsebovali tudi protitelesa EBV IgM, in med 45 vzorci z nizko avidnostjo protiteles CMV IgG kar 23 vzorcev (51,1 %), ki so vsebovali protitelesa EBV IgM.



- Zaradi potrditve in natančne opredelitve 23 rezultatov v skupini potrjenih akutnih okužb s citomegalovirusom (prisotna specifična protitelesa razreda IgM in IgG z nizko avidnostjo) smo rezultate testiranja na EBV IgM in EBV IgG preverili in nadgradili z metodo imunoblot. Ugotovili smo, da je pri 20 osebah, izmed 45 akutno okuženih bolnikov z virusom CMV, šlo za reaktivacijo imunskega odgovora z virusom EBV, kar smo potrdili z reaktivnostjo serumov proti rekombinantnim antigenom EBV.
- Sklepamo, da je pri akutno okuženih bolnikih z virusom CMV kar polovica bolnikov takih, pri katerih lahko dokažemo istočasno tudi protitelesa razreda IgM proti virusu EBV, ki so hipotetično lahko posledica reaktivacije virusa EBV.

## 6 POVZETEK

Citomegalovirus (CMV) in virus Epstein Barr (EBV) sta velika in kompleksna DNA virusa iz družine *Herpesviridae*. Povzročata trajne in latentne okužbe. Prenašata se s slino, virus CMV pa se lahko prenaša tudi z drugimi telesnimi tekočinami. Pri večini oseb, ki pridejo v stik z virusoma, se pojavlja asimptomatska okužba, lahko pa pride do razvoja resnejše klinične slike. Oba virusa pri človeku povzročata infekcijsko mononukleozo, ki je na podlagi kliničnih in laboratorijskih znakov praktično neločljiva, zato za razjasnitev klinične slike pogosto uporabljajo laboratorijske teste za dokaz specifičnih protiteles razreda IgM in IgG. Za dokaz okužbe z virusom CMV dodatno določajo avidnost specifičnih protiteles IgG. V diplomski nalogi smo sistematično preverili, kakšen je serološki profil specifičnih protiteles proti virusu EBV pri bolnikih, ki so prebolevali akutno okužbo z virusom CMV. V letu 2009 so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo med 2152 testiranimi vzroci odkrili 108 oseb z dokazanimi protitelesi proti virusu CMV razreda IgM. Med 108 vzorci s specifičnimi protitelesi CMV IgM smo ugotovili 93 serumov, v katerih so bila prisotna tudi specifična protitelesa CMV IgG. Tem vzorcem smo določili tudi avidnost. Ugotovili smo, da je nizko avidnost CMV IgG imelo 45 oseb, pri katerih smo tako potrdili akutno okužbo z virusom CMV. Določili smo tudi specifična protitelesa proti virusu EBV in ugotovili, da je 107 od 108 testiranih oseb imelo protitelesa proti vsaj enemu antigenu virusa EBV. Ugotovili smo, da je pri osebah z visoko avidnimi protitelesi CMV IgG samo 25 % oseb, ki imajo prisotna tudi protitelesa EBV IgM. Pri osebah z nizko avidnostjo protiteles CMV IgG oz. s potrjeno akutno okužbo s CMV je bilo takih več kot 50 %. Osredotočili smo se na 23 serumov s prisotnimi protitelesi CMV IgM, protitelesi CMV IgG z nizko avidnostjo in protitelesi EBV IgM. Da bi predhodne rezultate potrdili, smo jih testirali z metodo imunoblot. Ugotovili smo, da je pri 20 osebah, izmed 45 akutno okuženih bolnikov s CMV, šlo za reaktivacijo imunskega odgovora z EBV, kar smo potrdili z reaktivnostjo serumov proti rekombinantnim antigenom EBV. Sklepamo, da je pri mladostnikih in odraslih akutno okuženih z virusom CMV skoraj polovica takih pri katerih lahko dokažemo hkrati tudi protitelesa razreda IgM proti virusu EBV, ki so najverjetneje posledica reaktivacije virusa EBV.

## 7 VIRI

Aalto S.M., Linnavuori K., Peltola H., Vuori E., Weissbrich B., Schubert J., Hedman L., Hedman K. 1998. Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *Journal of Medical Virology*, 56, 3: 186-191.

Auwaerter P.G. 1999. Infectious mononucleosis in middle age. *JAMA*, 281, 5: 454-459.

CDC. 2010. Cytomegalovirus (CMV) and congenital CMV infection. Clifton, CDC-National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases: Istr..

<http://www.cdc.gov/cmV/index.html> (junij 2010)

Cohen J.L. 1998. Epstein-Barr virus infections, including infectious mononucleosis. V: *Harrison's principles of internal medicine*. 14<sup>th</sup> ed. Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J. (eds.). New York, McGraw-Hill: 1089-1091.

Deyi M.Y., Goubau P., Bodeus M. 2000. False positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 7: 557-560.

Drinovec B. 2005. Poimenovanje in razvrstitev virusov. V: *Splošna medicinska virologija*. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-21.

Golaszewska E., Kurowska E., Duk M., Koscielak J. 2003. Paul-Bunnell antigen and possible mechanism of formation of heterophile antibodies in patients with infectious mononucleosis. *Acta Biochimica Polonica*, 50, 4: 1205-1211.

Hess R.D. 2004. Routine Epstein Barr virus diagnostics from the laboratory perspective:



cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 4: 747-756.

Lenette E.T. 1999. Epstein Barr Virus. V: *Manual of clinical microbiology*. 7<sup>th</sup> ed. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. (eds.). New York, American Society of Microbiology: 912-918.

Linde A., Fridell E., Dahl H., Andersson J., Biberfeld P., Wahren B. 1990. Effect of primary Epstein-Barr virus infection on human herpes virus 6, cytomegalovirus, and measles virus immunoglobulin G titers. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2: 211-215.

Marin J. 1990. Prispevek k poznavanju vloge virusa Epstein Barr v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 59, 9: 405-408.

Marin J. 1999. Povezanost med okužbo s herpesvirusi in nastankom neoplazem pri ljudeh. *Zdravniški vestnik*, 68, 5: 309-312.

Mikrogen. 2008. *recomLine EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM test*. Neuried, Mikrogen GmbH: 15-27.

Park J.M., Shin J.I., Lee J.S., Jang Y.H., Kim S.H., Lee K.H., Lee C.H. 2009. False positive immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus in child with infectious mononucleosis caused by Epstein Barr virus infection. *Yonsei Medical Journal*, 50, 5: 713-716.

Rowe M., Zuo J. 2010. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8<sup>+</sup> T cell immunity. *Microbes and Infection*, 12, 3: 173-181.

Strašek K., Marin J. 2001. Okužbe z virusom Epstein Barr – določanje avidnosti protiteles IgG. Zdravniški vestnik, 70, 6: 321-323.

Zenda T., Itoh Y., Takayama Y., Masunaga T., Asaka S., Oiwake H. 2004. Significant liver injury with dual positive IgM antibody to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus as puzzling initial Manifestation of infectious mononucleosis. Internal Medicine, 43, 4: 340-343.

## ZAHVALA

Z diplomsko nalogo se zaključuje moje najlepše učno obarvano obdobje življenja.

Kot prvemu se zato zahvaljujem doc. dr. Miroslavu Petrovcu, dr. med., da me je kljub prenatrpanemu urniku sprejel pod svoje mentorstvo in me s strokovnim svetovanjem, potrpežljivostjo ter spodbudo vodil v pravo smer med nastajanjem diplomskega dela.

Iskrena hvala gre Tanji Kozinc za vso pomoč pri praktičnem delu.

Zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Tatjani Avšič Županc, ki mi je bila v pomoč pri zaključevanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre družini, ki mi je nesebično pomagala tako s pohvalami kot z nasveti in grajami ter mi študij tudi finančno omogočila.

Hvala Mateju, ki me sprejema, tako kot sem, in izvabi iz mene najboljše. V vseh mojih vzponih in padcih je verjel vame in me optimistično spodbujal.

Hvala tudi vsem sošolcem, ki so mi kakor koli pomagali skozi lepe, naporene študijske dni.

Zahvaljujem se tudi prijateljem, ki so mi nudili moralno podporo.





Nadaljevanje priloge A: Rezultati določanja specifičnih protiteles proti virusu Epstein Barr in citomegalovirusu pridobljeni z diagnostično metodo Liaison.

31	48,2	poz	4,6	poz	N	neg	neg	380	poz	neg	neg	neg	neg
32	65,9	poz	6	poz	N	neg	neg	69,3	poz	>600	poz	neg	neg
33	65,6	poz	1,7	poz	N	neg	neg	185	poz	75,2	poz	neg	neg
34	>240	poz	1,1	poz	N	neg	neg	95,4	poz	280	poz	neg	neg
35	>240	poz	1	poz	N	neg	neg	>750	poz	>600	poz	neg	neg
36	111	poz	2,9	poz	N	neg	neg	54,1	poz	183	poz	neg	neg
37	63,8	poz	10,1	poz	N	neg	neg	>750	poz	466	poz	neg	neg
38	101	poz	4,6	poz	N	neg	neg	33,6	poz	>600	poz	neg	neg
39	60	poz	7,1	poz	N	neg	neg	599	poz	215	poz	neg	neg
40	95,7	poz	8,9	poz	N	neg	neg	>750	poz	187	poz	neg	neg
41	183	poz	1,1	poz	N	neg	neg	196	poz	>600	poz	neg	neg
42	>240	poz	0,77	poz	N	neg	neg	20,6	poz	>600	poz	neg	neg
43	89,5	poz	2,5	poz	N	neg	neg	307	poz	25,6	poz	neg	neg
44	148	poz	2,2	poz	N	neg	neg	>750	poz	52,5	poz	neg	neg
45	80,1	poz	20,2	poz	N	neg	neg	678	poz	133	poz	neg	neg
46	53	poz	mv(0,45)	mv	nt	neg	neg	>750	poz	113	poz	>150	poz
47	80,3	poz	mv(0,6)	mv	nt	neg	neg	>750	poz	>600	poz	neg	neg
48	87,9	poz	mv(0,49)	mv	nt	neg	neg	194	poz	>600	poz	neg	neg
49	82,5	poz	mv(0,43)	mv	nt	neg	neg	>750	poz	130	poz	neg	neg
50	60,2	poz	neg	neg	nt	>160	poz	158	poz	neg	neg	>150	poz
51	60,8	poz	neg	neg	nt	mv(24)	mv	52	poz	341	poz	neg	neg
52	56,3	poz	neg	neg	nt	mv(34,9)	mv	210	poz	34,3	poz	neg	neg
53	62,4	poz	neg	neg	nt	neg	neg	326	poz	>600	poz	neg	neg
54	63,3	poz	neg	neg	nt	neg	neg	645	poz	>600	poz	neg	neg
55	110	poz	neg	neg	nt	neg	neg	159	poz	22	poz	neg	neg
56	69,1	poz	neg	neg	nt	neg	neg	425	poz	>600	poz	neg	neg
57	44,3	poz	neg	neg	nt	neg	neg	312	poz	313	poz	neg	neg
58	76,2	poz	neg	neg	nt	neg	neg	neg	neg	238	poz	neg	neg
59	54,6	poz	neg	neg	nt	neg	neg	>750	poz	>600	poz	neg	neg
60	108	poz	neg	neg	nt	neg	neg	45,2	poz	233	poz	neg	neg

Nadaljevanje priloge A: Rezultati določanja specifičnih protiteles proti virusu Epstein Barr in citomegalovirusu pridobljeni z diagnostično metodo Liaison.

61	85,1	poz	1,3	poz	S	51,7	poz	>750	poz	30,2	poz	neg	neg
62	116	poz	9,3	poz	S	58,7	poz	>750	poz	>600	poz	neg	neg
63	>240	poz	6,8	poz	S	60,3	poz	>750	poz	165	poz	neg	neg
64	155	poz	4,6	poz	S	63	poz	218	poz	>600	poz	neg	neg
65	35,3	poz	11,9	poz	S	neg	neg	>750	poz	mv(13,3)	mv	neg	neg
66	71,3	poz	2,3	poz	S	neg	neg	>750	poz	>600	poz	neg	neg
67	>240	poz	2,5	poz	S	neg	neg	419	poz	361	poz	neg	neg
68	119	poz	7,1	poz	S	neg	neg	513	poz	>600	poz	neg	neg
69	65,7	poz	16,3	poz	V	40	poz	167	poz	138	poz	neg	neg
70	43,6	poz	2,4	poz	V	146	poz	253	poz	352	poz	neg	neg
71	97,3	poz	1,8	poz	V	>160	poz	68,4	poz	339	poz	80,4	poz
72	41,5	poz	>22	poz	V	>160	poz	211	poz	mv(6,4)	mv	>150	poz
73	30,4	poz	18,3	poz	V	>160	poz	139	poz	neg	neg	>150	poz
74	37,7	poz	2	poz	V	>160	poz	30,3	poz	neg	neg	neg	neg
75	56,3	poz	17,7	poz	V	>160	poz	749	poz	>600	poz	neg	neg
76	30,4	poz	5,7	poz	V	>160	poz	127	poz	64,1	poz	neg	neg
77	36,8	poz	1,6	poz	V	>160	poz	>750	poz	519	poz	neg	neg
78	>240	poz	2,8	poz	V	>160	poz	44,1	poz	53	poz	neg	neg
79	37,8	poz	7	poz	V	mv(25,3)	mv	558	poz	neg	neg	neg	neg
80	55,1	poz	2,2	poz	V	mv(25,8)	mv	356	poz	344	poz	neg	neg
81	39,1	poz	>22	poz	V	neg	neg	514	poz	38,3	poz	120	poz
82	45,6	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	>600	poz	>150	poz
83	78,2	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	322	poz	>150	poz
84	69,6	poz	>22	poz	V	neg	neg	347	poz	31,9	poz	>150	poz
85	96,7	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	>600	poz	>150	poz
86	64,8	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	mv(8,8)	mv	neg	neg
87	57,4	poz	57,4	poz	V	neg	neg	84,7	poz	neg	neg	neg	neg
88	72	poz	2,4	poz	V	neg	neg	515	poz	356	poz	neg	neg
89	63,5	poz	13,3	poz	V	neg	neg	287	poz	105	poz	neg	neg
90	36	poz	2,9	poz	V	neg	neg	105	poz	597	poz	neg	neg

Nadaljevanje priloge A: Rezultati določanja specifičnih protiteles proti virusu Epstein Barr in citomegalovirusu pridobljeni z diagnostično metodo Liaison.

91	39	poz	3,2	poz	V	neg	neg	185	poz	>600	poz	neg	neg
92	70,1	poz	9,9	poz	V	neg	neg	175	poz	>600	poz	neg	neg
93	31,2	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	319	poz	neg	neg
94	37,9	poz	>22	poz	V	neg	neg	226	poz	>600	poz	neg	neg
95	54,7	poz	7,7	poz	V	neg	neg	>750	poz	509	poz	neg	neg
96	39,8	poz	2,7	poz	V	neg	neg	65,8	poz	72,3	poz	neg	neg
97	60,6	poz	11,8	poz	V	neg	neg	475	poz	539	poz	neg	neg
98	48,8	poz	5,8	poz	V	neg	neg	>750	poz	342	poz	neg	neg
99	57,9	poz	18,4	poz	V	neg	neg	501	poz	92,7	poz	neg	neg
100	36,9	poz	1,1	poz	V	neg	neg	205	poz	509	poz	neg	neg
101	50,3	poz	7,5	poz	V	neg	neg	>750	poz	398	poz	neg	neg
102	34,6	poz	2	poz	V	neg	neg	76,3	poz	54,8	poz	neg	neg
103	47	poz	11,1	poz	V	neg	neg	228	poz	>600	poz	neg	neg
104	72,9	poz	8,5	poz	V	neg	neg	660	poz	>600	poz	neg	neg
105	31,4	poz	9,7	poz	V	neg	neg	>750	poz	543	poz	neg	neg
106	54,4	poz	14,9	poz	V	neg	neg	655	poz	>600	poz	neg	neg
107	93,6	poz	2,9	poz	V	neg	neg	538	poz	82,5	poz	neg	neg
108	57,6	poz	>22	poz	V	neg	neg	>750	poz	96,3	poz	neg	neg

**Priloga B: Rezultati diagnostičnega sistema *recomLine* EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM za protitelesa IgG proti virusu EBV.**

ŠT. VZ.	WB EBNA-1	INT WB EBNA-1	WB VCA p18	WB VCA p23	INT WB VCA	WB BZLF1	INT WB BZLF1	WB EA p138	WB EA p54	INT WB EA
23	+++	poz	++	+++	poz	++	poz	-	-	neg
14	+++	poz	++	++	poz	+	poz	-	-	neg
11	++	poz	+++	+++	poz	++	poz	+++	+-	poz
15	++	poz	+++	+++	poz	++	poz	+-	-	neg
9	++	poz	++	++	poz	++	poz	-	++	poz
22	++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	-	-	neg
5	++	poz	-	+	poz	+++	poz	+	++	poz
2	++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	-	-	neg
10	++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	-	+++	poz
18	+++	poz	+++	++	poz	-	neg	+-	+-	neg
7	+++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	-	+++	poz
8	+++	poz	+++	+++	poz	++	poz	-	+	poz
16	++	poz	++	++	poz	++	poz	-	+-	neg
17	+++	poz	+++	+++	poz	-	neg	+-	-	neg
3	+++	poz	+++	+++	poz	++	poz	-	+++	poz
6	-	neg	++	++	poz	++	poz	++	++	poz
21	+++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	+	-	poz
20	+++	poz	+++	+++	poz	++	poz	-	-	neg
12	+++	poz	+++	+++	poz	+	poz	-	+++	poz
19	+++	poz	+++	+++	poz	+	poz	-	-	neg
4	+++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	+++	++	poz
13	+++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	++	-	poz
1	++	poz	+++	+++	poz	+++	poz	+-	-	neg

**Priloga C: Rezultati diagnostičnega sistema *recomLine EBV IgG (Avidity) (IgA), IgM za protitelesa IgM proti virusu EBV.***

ŠT. VZ.	WB VCA p23	INT WB VCA p23	WB IEA ZEBRA	INT WB IEA ZEBRA	WB EA p138	WB EA p54	INT WB EA
23	++	poz	+-	neg	+	+++	poz
14	-	neg	-	neg	-	++	poz
11	++	poz	-	neg	-	+++	poz
15	-	neg	-	neg	+	++	poz
9	+-	neg	+-	neg	+-	+++	poz
22	-	neg	+	poz	+-	+	poz
5	-	neg	-	neg	-	-	neg
2	-	neg	-	neg	-	++	poz
10	-	neg	-	neg	-	++	poz
18	-	neg	-	neg	-	+++	poz
7	++	poz	-	neg	+-	++	poz
8	-	neg	-	neg	-	+++	poz
16	-	neg	-	neg	+-	-	neg
17	+++	poz	-	neg	+-	++	poz
3	-	neg	-	neg	-	-	neg
6	+-	neg	+-	neg	-	+++	poz
21	-	neg	+-	neg	++	-	poz
20	-	neg	-	neg	-	+	poz
12	-	neg	-	neg	+-	+	poz
19	-	neg	-	neg	++	++	poz
4	+-	neg	-	neg	+++	+++	poz
13	++	poz	+-	neg	+	+++	poz
1	-	neg	-	neg	-	++	poz