

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA KOBE

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA KOBE

**PRIMERJAVA TREH METOD ZA DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES
PROTI VIRUSU EPSTEIN BARR**

**COMPARISON OF THREE METHODS FOR DETECTION OF SPECIFIC
ANTIBODIES AGAINST THE VIRUS EPSTEIN BARR**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca., dr. med.

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Zahvala

Ob zaključku prehojene poti bi se rada zahvalila ljudem, ki so mi jo pomagali graditi in napolniti.

Posebna zahvala gre mojemu mentorju doc.dr. Miroslavu Petrovcu za številne izčrpne razgovore z veliko mero potrpežljivosti, razumevanja in zaupanja. Iskrena hvala za strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala tudi vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki ste mi omogočili nastanek tega dela.

Hvala domačim, ki ste tej poti dali temelje veliko prej, preden se je začela. Naučili ste me opazovati, občudovati, spoštovati in razumeti. Hvala za podporo, spodbudo, pomoč in odobravanje. Hvala, ker ste bili vedno tam. Hvala bratu Alešu za brezpogojno pomoč tekom študija, brez tebe bi bila pot manj zanimiva in dolgočasna.

Iskrena hvala Jasni in Samotu za vzpodbudo in življenjske nauke. Hvala tebi Aleš, ker si postal del te poti, mi jo pomagal zvijugati in zapeljati tja kamor sama ne bi zmogla.

In hvala vam, prijatelji za vse trenutke, ki smo jih preživeli skupaj. Pot ste napolnili s spomini, ki se jih bomo vedno spominjali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Miroslava Petrovca, dr. med.

Ljubljana, september 2010

Maja Kobe

KAZALO

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
SEZNAM SLIK	VII
SEZNAM PREGLEDNIC	VIII
1. UVOD	1
1. 1 TAKSONOMSKA VRSTITEV VIRUSA EPSTEIN BARR.....	2
1. 2 ZGRADBA VIRUSA.....	3
1. 3 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA	4
1. 4 VIRUSNI GENOM	5
1. 5 ANTIGENSKE ZNAČILNOSTI VIRUSA.....	6
1. 5. 1 Proteini latentne stopnje	6
1. 5. 2 Proteini litične stopnje.....	8
1. 5. 3 Vzpostavitev nesmrtnosti celice	8
1. 6 PATOGENEZA VIRUSA EPSTEIN BARR.....	9
1. 7 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO	13
1. 7. 1 Humoralni imunski odziv.....	13
1. 7. 2 Celični imunski odziv	16
1. 8 BOLEZNI POVEZANE Z VEB	16
1. 8. 1 Infekcijska mononukleoza	17
1. 9 EPIDEMIOLOGIJA	18
1. 9. 1 Način prenosa virus.....	18
1. 9. 2. Razširjenost VEB v Sloveniji.....	19
1. 10 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VEB	19
1. 10. 1 Neposredne metode za dokazovanje VEB	19
1. 10. 1. 1. Hibridizacija in situ	20
1. 10. 1. 2 Verižna reakcija s polimerazo	21
1. 10. 1. 3 Hibridizacija po Southernu	21
1. 10. 1. 4 Opazovanje virusov z elektronskim mikroskopom	21
1. 10. 2 Posredne metode za dokazovanje VEB	23
1. 10. 2. 1. Paul Bunellova reakcija	23

1. 10. 2. 2 Posredna imunofluorescenčna metoda-IFA	23
1. 10. 2. 3 Encimsko imunska metoda	24
1. 10. 2. 4 Imunska blot metoda	25
1. 11 KEMILUMINISCENČNA IMUNSKA METODA	25
1. 12 MULTIPLEKS METODA ZA DOLOČANJE VEB	25
2 NAMEN DELA.....	29
3 MATERIALI IN METODE	30
3. 1 VZORCI.....	30
3. 2 LABORATORIJSKA OPREMA IN REAGENTI.....	30
3. 2. 1 Priprava vzorcev.....	32
3. 2. 2 Priprava izpiralnega pufra (1x wash)	32
3. 2. 3 Predpriprava suspenzije polistirenskih kroglic	32
3. 3 METODE DELA	33
3. 3. 1 Kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA)	33
3. 3. 2. Multipleks metoda za določanje protiteles proti VEB	34
3. 3. 2. 1 Princip testa	35
3. 3. 2. 2 Postopek izvedbe testa z diagnostičnim kompletom Plexus ...	36
3. 3. 2. 3 Postopek izvedbe testa z diagnostičnim kompletom AtheNA ..	37
3. 3. 3 Vrednotenje rezultatov	37
3. 3. 3. 1 Vrednotenje rezultatov : AtheNA Multi-Lyte	37
3. 3. 3. 2 Vrednotenje rezultatov : Plexus™	39
3. 3. 3. 3 Vrednotenje rezultatov: Liaison	40
3. 3. 3. 4 Vrednotenje rezultatov: status okužbe	40
3. 3. 3. 5 Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti testov	42
4 REZULTATI	43
4. 1 Primerjava rezultatov med testoma Liaison in Plexus	44
4. 2 Primerjava rezultatov med testoma Liaison in AtheNA.....	46
4. 3 Rezultati skladnosti treh metod.....	48
5 RAZPRAVA	52
6 SKLEPI	56
7 LITERATURA	58

POVZETEK

Virus Epstein Barr ali človeški herpesvirus 4 je povzročitelj številnih bolezni, kot so infekcijska mononukleozna, karcinom nosno-žrelnega prostora, Burkittov limfom in druge limfoproliferativne bolezni. Organizem gostitelja odgovori na okužbo z virusom Epstein Barr s tvorbo različnih protiteles, specifičnih za različne virusne antigene

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti serološki odziv preiskovancev, okuženih z virusom Epstein Barr z modernima multipleks metodama, ki temeljita na uporabi fluorescentnih barvil, dveh različnih proizvajalcev: Focus Diagnostics in Zeus Scientific, ter rezultate primerjati z rezultati, ki so jih pridobili s kemiluminiscenčno metodo, proizvajalca Liaison.

V raziskavo smo vključili 150 zaporednih vzorcev preiskovancev s sumom na okužbo z virusom, ki so bili poslani v redno diagnostiko za virusne okužbe. Rezultate treh metod smo primerjali in ugotavljali odstotek ujemanja testov. Najboljše ujemanje z rutinsko diagnostično metodo s testom Liaison smo ugotovili z multipleks testom Plexus, proizvajalca Focus Diagnostics 80,0% (120). Z multipleks testom AtheNA, proizvajalca Zeus Scientific pa smo ugotovili 78% (117) ujemanje glede na rutinsko diagnostično metodo. Multipleks testa sta bila med seboj primerljiva.

Dokazali smo, da je kemiluminiscenčni test primeren za zaznavanje okužb z virusom Epstein Barr. Zelo dobro pa so primerljivi rezultati z diagnostičnim testom Plexus, ki nam poleg specifičnih protiteles omogoča določati še nespecifična protitelesa. Slabše primerljive rezultate, smo ugotovili s testom AtheNA, ki se lahko uporablja za preverjanje in potrditev neopredeljivih rezultatov, saj omogoča interpretacijo lažno pozitivnih rezultatov, ob morebitni prisotnosti revmatoidnega faktorja.

ABSTRACT

Epstein Barr virus or human herpesvirus 4 is causer of many diseases such as infectious mononucleosis, nasal and throat cancer, Burkitt lymphoma and other lymphoproliferative diseases. Organism of the host responds to Epstein Barr virus infection by forming different antibodies specific for different viral antigens.

In my dissertation we wanted to determine serological response of subjects infected with Epstein Barr virus with modern multiplex methods based on the use of florescent dyes made by two different manufactures: Focus Diagnostics and Zeus Scientific and compare results with results acquired by chemiluminescence method of Liaison manufacturer.

In our study we included 150 consecutive samples of subjects with suspected infection who were regularly sent to the diagnosis of viral infection. We compared results of three methods in order to determine match percentage of test results. Best matching with routine diagnostic method was achieved between Liaison test and Plexus Multiplex test from Focus Diagnostics manufacturer 80,0% (120). Multiplex test AtheNa from Zeus Scientific manufacturer showed 78,0% (117) match by comparison to routine diagnostic method. Multiplex tests were comparable.

We have proved that chemiluminescence test is appropriate for detecting Epstein Barr virus infection. Diagnostic Plexus test, which besides specific antibodies allows us to determine non-specific antibodies, also gave well comparable results. With AtheNA test we determined worse comparable results, but AtheNA test can be used for checking and confirming undefined results because it allows interpretation of false positive results with eventual presence of rheumatoid factor.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	akutna okužba
ACIF	antikomplementna imunofluorescenca (ang.: anticomplement immunofluorescence assay)
AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (ang.: acquired immunodeficiency syndrome)
AU	akutna zgodnja okužba
BL	Burkittov limfom (ang.: Burkitt's lymphoma)
CLIA	kemiluminiscenčni test (ang.: chemiluminescence immunoassay)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EA	zgodnji antigen (ang.: early antigen)
EBER	RNK, ki jo kodira Epstein-Barr (ang.: Epstein-Barr encoded RNA)
EBNA	Epstein-Barr jedrni antigen (ang.: Epstein-Barr nuclear antigen)
ELISA	encimsko-imunski test (ang.: enzyme linked immunosorbent assay)
FITC	fluorescein izotiocianat
HB	Hodgkinova bolezen
HHV	človeški herpes virus (ang.: human herpes virus)
HIV	človeški virus imunske pomanjkljivosti (ang.: human immunodeficiency virus)
HRP	hrenova peroksidaza
gp	glikoprotein
IL	interlevkin
IFA	posredna imunofluorescenčna metoda-IFA (ang. immunofluorescent assay)
IM	infekcijska mononukleoza
IR	notranje ponovitve (ang.: internal repeats)

K	konvalescenca
kbp	kilo bazni par
kDa	kilo Dalton
KNŽ	karcinom nosno-žrelnega prostora (ang.: NPC-nasopharyngeal carcinoma)
LMP	latentni membranski proteini
MA	matriksni protein
N	odsotnost okužbe
nm	nanometer
NSC	nespecifična kontrola (ang.: non specific control)
OHL	ustna lasasta levkoplakija (ang.: oral hairy leukoplakia)
O	občutljivost
P	pretekla okužba
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang.: polymerase chain reaction)
PTLD	limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov in kostnega mozga (ang.: post transplant lymphoproliferative disease)
R	reaktivacija
RLU	relativne luminiscenčne enote (ang.: relative luminescence units)
RNK	ribonukleinska kislina
S	specifičnost
U	ujemanje
VCA	Virusni kapsidni antigen (ang.: viral capsid antigen)
VEB	Virus EpsteinBarr

SEZNAM SLIK

- Slika 1** Zgradba virusa Epstein Barr, prečni prerez
- Slika 2** Genom VEB, geni latentne stopnje
- Slika 3** Odprti bralni okvirji restrikcijske mape BamH1 za latentne proteine
- Slika 4** Prikaz transkripcije, translacije in replikacije DNK herpesvirusa
- Slika 5** Shematski prikaz ekspresije genov VEB v odvisnosti od časa in dogodka v celici po infekciji, kot posledica ekspresije
- Slika 6** Shematski prikaz poteka primarne okužbe (stopnje latence)
- Slika 7** Shematski prikaz poteka perizistentne okužbe (stopnje latence)
- Slika 8** Shematski prikaz okužbe limfocitov B z VEB
- Slika 9** Časovno pojavljanje protiteles po okužbi z VEB
- Slika 10** Burkittov limfom pri sedemletnem dečku (tumor spodnje čeljusti)
- Slika 11** Okuženost z VEB glede na starost (leta)
- Slika 12** Hibridizacija *in situ*
- Slika 13** Shematski prikaz principa PCR
- Slika 14** Shematski prikaz hibridizacije po Southernu
- Slika 15** VEB z elektronskim mikroskopom
- Slika 16** Encimsko imunski test (ELISA) za dokaz protivirusnih protiteles
- Slika 17** Shematski prikaz imunskega kompleksa z metodo CLIA
- Slika 18** Prikaz testne plošče s kroglično raztopino in velikostjo kroglic v raztopini
- Slika 21** Analizator Luminex (Austin, Texas, ZDA)
- Slika 22** Grafična predstavitev števila preiskovancev po posameznih starostnih skupinah
- Slika 23** Ujemanje števila vzorcev glede na status okužbe
- Slika 24** Prikaz akutne in pretekle okužbe glede na starostno skupino

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I	Razvrstitev človeških herpesvirusov (družina <i>Herpesviridae</i>)
Preglednica II	Pregled bolezni povezanih z VEB
Preglednica III	Interpretacija rezultatov diagnostičnega kompleta AtheNA Multi-Lyte v AU/ml (Zeus Scientific)
Preglednica IV	Interpretacija rezultatov diagnostičnega kompleta Plexus™ (Focus Diagnostics)
Preglednica V	Interpretacija rezultatov kemiluminiscenčnega testa Liaison (Diasorin)
Preglednica VI	Serološki status okužbe z VEB
Preglednica VII	Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti VEB s testoma Liaison in Plexus
Preglednica VIII	Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti VEB s testoma Liaison in AtheNA
Preglednica IX	Skladnost rezultatov serološkega statusa testov AtheNA in Plexus v primerjavi s testom Liaison
Preglednica X	Prikaz rezultatov dveh testov (Liaison, Plexus) in testa AtheNA z interpretacijo NSC pri sedmih preiskovancih

1 UVOD

Virus Epstein Barr (VEB) je ime dobil po dveh angleških znanstvenikih Epstein-u in Barr-u. Razširjen je povsod po svetu, okužbe so pogoste zelo zgodaj v otroštvu, z njim pa je v razvitih državah okuženih 80-90 % vseh odraslih ljudi. V manj razvitih državah naj bi do okužb z virusom prišlo že pri večini otrok do drugega leta starosti. Okužba z virusom v večini primerov poteka brez simptomov, kadar pa se klinična slika izrazi, največkrat bolezen poteka kot sindrom infekcijske mononukleoze. Ozdravitev po primarni okužbi v večini primerov je spontana. Okužbe z virusom povezujejo z nastankom tumorjev. Za prenos okužbe je potreben tesen stik (1,2).

Primarna okužba z VEB se začne z vstopom v epitelne celice nosno-žrelnega prostora, kjer poteka razmnoževanje in izločanje virusa. Naslednje celice, ki jih virus okuži so limfociti B, kjer ostane doživljenjsko, hkrati pa se iz njih razširi še na druga tkiva. Zaradi onkogenega potenciala transformira limfocite B, kar ob imunski oslabelosti lahko povzroči nastanek limfomov. Virus po primarni fazi bolezni vstopi v latentno fazo.

Organizem gostitelja odgovori na okužbo z virusom Epstein Barr s tvorbo različnih protiteles, specifičnih za različne virusne antigene. Po primarni okužbi se pojavijo protitelesa proti zgodnjemu in virusnemu kapsidnemu antigenu, nekaj tednov po okužbi pa še protitelesa proti jedrnemu antigenu, ki uravnavajo latenco (3).

V začetni fazi okužbe je za ugotavljanje okužbe z virusom pomembno, da je diagnostični postopek hiter in specifičen. Danes v vsakdanji diagnostiki uporabljajo metode na osnovi kemiluminiscence, s katerimi dokazujejo protitelesa proti nativnim in rekombinantnim antigenom, ki so vezani na trden nosilec. V zadnjem času pa so zaradi dobre občutljivosti, specifičnosti in enostavnosti testov zelo popularne tako imenovane multipleks metode. Uporabljamo tudi molekularno biološke metode, s katerimi dokazujemo genom VEB (1).

1. 1 TAKSONOMSKA UVRSTITEV VIRUSA EPSTEIN- BARR

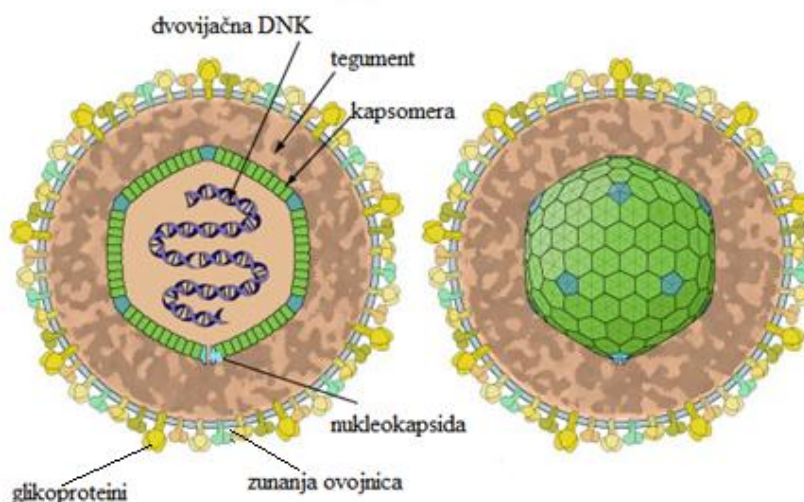
Virus Epstein- Barr (VEB) je DNK virus, član družine herpesvirusov (*Herpesviridae*), poddružine gamaherpesvirusov (*Gammaherpesvirinae*) in rodu limfokriptovirusov (*Lymphocryptovirus*). Je eden izmed osmih znanih človeških herpesvirusov, ki so patogeni za človeka, katerih delitev poteka na osnovi njihovih bioloških značilnosti. Posamezne vrste virusa povzročajo specifične bolezni. Njegovo uradno poimenovanje je humani herpesvirus 4 (HHV-4). Poznamo še preko 100 drugih herpesvirusov, ki okužijo številne živalske vrste (različne vrste opic, prašiče, govedo, konje, miši in druge) (1).

Preglednica I: Razvrstitev človeških herpesvirusov (družina *Herpesviridae*)(1,2,3).

PODDRUŽINA	ROD	OZNAKA IN URADNO POIMENOVANJE	POGOSTO POIMENOVANJE	GLAVNE BIOLOŠKE ZNAČILNOSTI
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	človeški herpesvirus 1 HHV- 1	virus herpesa simpleksa tip 1	hitro rastoči, citolitični, latentni v nevronih
		človeški herpesvirus 2 HHV- 2	virus herpesa simpleksa tip 2	
	<i>Varicellovirus</i>	človeški herpesvirus 3 HHV- 3	virus varičele- zostra	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	človeški herpesvirus 5 HHV- 5	citomegalovirus	počasi rastoči, tvori celice velikanke, latentni v žlezah slinovkah, ledvicah
	<i>Roseolovirus</i>	človeški herpesvirus 6 HHV- 6	človeški herpesvirus tip 6	počasi rastoči, limfoproliferajoči, latentni v limfocitih
		človeški herpesvirus 7 HHV- 7	človeški herpesvirus tip	
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	človeški herpesvirus 4 HHV- 4	Virus Epstein Barr	variabilna hitrost rasti, limfoproliferajoči, latentni v limfocitih
		človeški herpesvirus 8 HHV- 8	Virus Kaposijevega sindroma	

1. 2 ZGRADBA VIRUSA

VEB je 150-200 nm velik virus z gostoto na gradientu cezijevega klorida 1,2-1,3 in molekulska masa 100×10^6 Da. Sestavljen je iz štirih morfoloških enot: sredice, kapside ali beljakovinskega plašča, tegumenta in zunanje ovojnice. Sredica VEB vsebuje linearno molekulo dvovijačne DNK, velikosti 184 bp. Obdaja jo kapsida ikozaedrične oblike, ki v premeru meri 100 nm (1).



Slika 1: Zgradba virusa Epstein Barr, prečni prerez.

Kapsida vsebuje 162 morfološko oblikovanih enot imenovane kapsomere, ki so sestavljene iz različnih proteinov. Amorfnoplast med nukleokapsido in zunanjo ovojnico se imenuje tegument, ki je fibrilne strukture in je tipična le za herpesviruse. Zunanja ovojnica, celičnega izvora je nepravilne oblike in meri v premeru 150 – 200 nm je iz lipidnega dvosloja, v katerega so vstavljeni glikoproteini, ki predstavljajo pglavitne virusne antigene in matriksne proteine MA(ang.: matrix antigen), ki se nahajajo v notranjem sloju ovojnice in niso glikolizirani (1,3).

1. 3 RAZMNOŽEVANJE VIRUSA

Razmnoževanje VEB poteka samo v živih celicah (v epitelijskih celicah nosno- žrelnega prostora in materničnega vratu, v limfocitih B, redko v limfocitih T, makrofagih in dendritičnih celicah) pri ljudeh in nekaterih primatih, ki imajo na svoji površini receptor CR2 oz. CR21 za virus Epstein Barr. Virusni genom ima celoten zapis za izgradnjo virusa, vendar mora gostiteljska celica zagotoviti potrebno energijo in pogoje za izdelavo novih virusov (1).

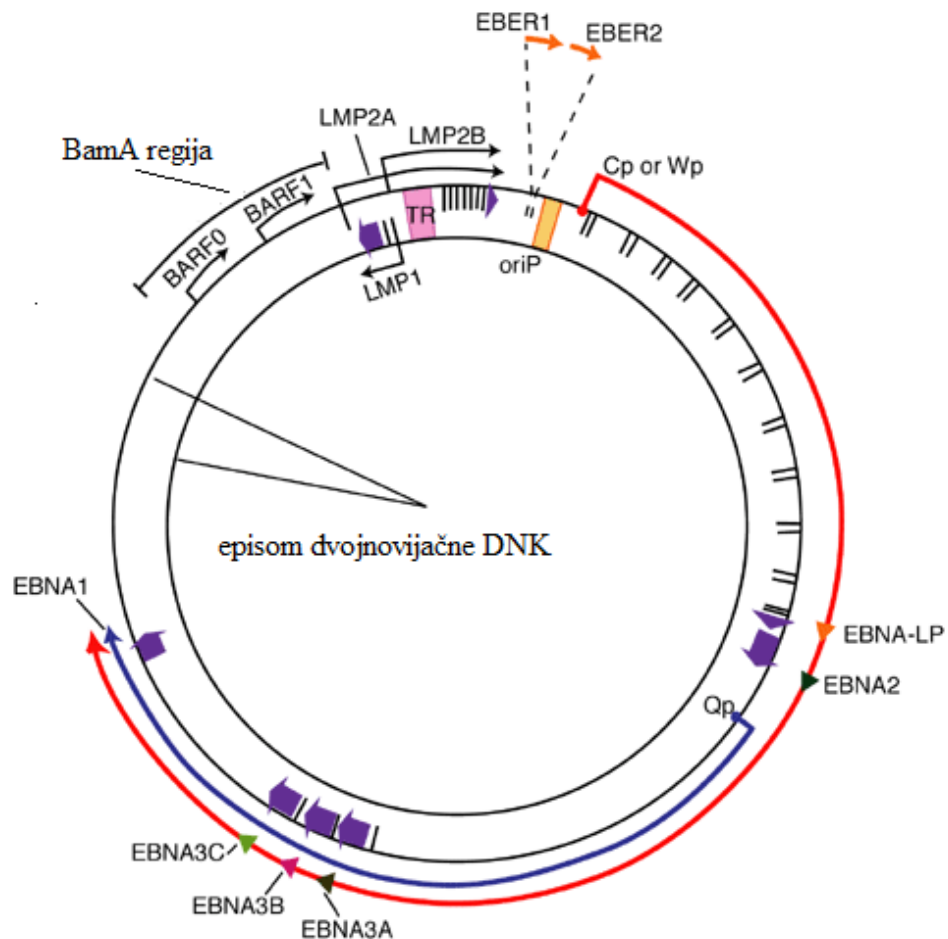
Pri virusni okužbi obstajata dva scenarija dogodkov. Virus lahko celico prisili, da vstopi v delitveni cikel, pri čemer se njihovo število močno poveča (latentna okužba). Pri tem se virusni genom ne vgradi v celičnega, temveč se zaokroži s terminalnimi ponavljajočimi zaporedji. To obliko imenujemo episom. Episom se pomnožuje skupaj s celično DNK in pridobi veliko kopij virusa v zelo kratkem času po infekciji, poleg tega pa se enakomerno razporeja v hčerinske celice, ki nastanejo po celični delitvi. Drug način širjenja virusa, pa se zgodi po vstopu virusa v jedro celice, ko njen metabolizem usmeri v začetek virusnega razmnoževanja, pri čemer se sproščajo novi infektivni virusi, ki lahko okužijo še neokužene celice (litična okužba) (1,4).

Človeka lahko okužita dva tipa VEB: VEB tip 1 in VEB tip 2 (alternativno imenovana A in B) , ki se razlikujeta v področjih, ki kodirajo virusne latentne proteine. Oba tipa ne kažeta specifične geografske razporeditve, kljub temu pa je tip A pogostejši v Evropi in ZDA. Noben tip ne kaže kakršnekoli povezave s specifično boleznijo. Razlike med tipoma se pojavljajo v mnogih ponovitvenih zaporedjih v posameznih notranjih ponovitvah, kar določa specifični izolat glede na velikost latentnih genov in/ali njihovih produktov. Analize teh genov se uporabljajo v epidemioloških študijah za spremljanje virusnega prenašanja med družinami in populacijami (1,4).

1. 4 VIRUSNI GENOM

Genom virusa Epstein Barr v zrelem virionu predstavlja linearna dvojnovijačna DNK dolžine 184 kbp. Strukturno genom vsebuje izmenične značilne odseke U (ang.: unique), notranje ponovitve IR (ang.: internal repeat) in končne ponovitve TR (ang.: terminal repeat). Vsebov deleža G+C je 59 %. Glede na poznani dve stanji genoma- aktivno in latentno, sta znani tudi dve mesti replikacije (1,4).

- *oriP*, ki se v latentnem ciklu nahaja v delu genoma *BamHI* (odprti bralni okvir latentnih proteinov VEB)
- *oriLyt*, kjer se začne replikacija med litičnim ciklom

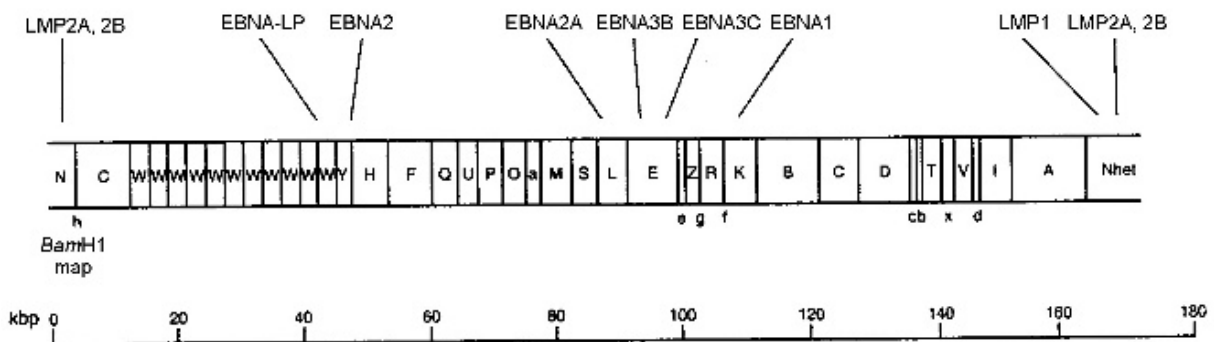


Slika 2 : Genom VEB, geni latentne stopnje.

1. 5 ANTIGENSKE ZNAČILNOSTI VIRUSA

Virus Epstein Barr na genomu kodira zapis za latentne in litične proteine. Vsebuje zapis, ki kodirajo proteine potrebne za vzpostavitev latence, encime za pomnoževanje DNK in strukturne proteine za virusno razmnoževanje, sestavljanje novih virusnih delcev. Vsebuje tudi zaviranje in spreminjanje imunskega odziva gostiteljske celice, ter sposobnost prehoda virusa iz latentnega (mirujočega ali neaktivnega razmnoževanja) v litično stanje (aktivnega razmnoževanja) in s tem uničenje celice.

Genom VEB kodira približno 70 različnih proteinov, od katerih vsi še niso poznani. VEB kodira še homologe človeških interleukinov (IL)-10 (BCRF1, ki se v litičnem ciklu izrazijo pozno) in celične gene preživetja bcl2 (BHRF1 kodira zgodnji protein), ki naj bi bili pomembni za imunski odgovor in celično preživetje (1,3).



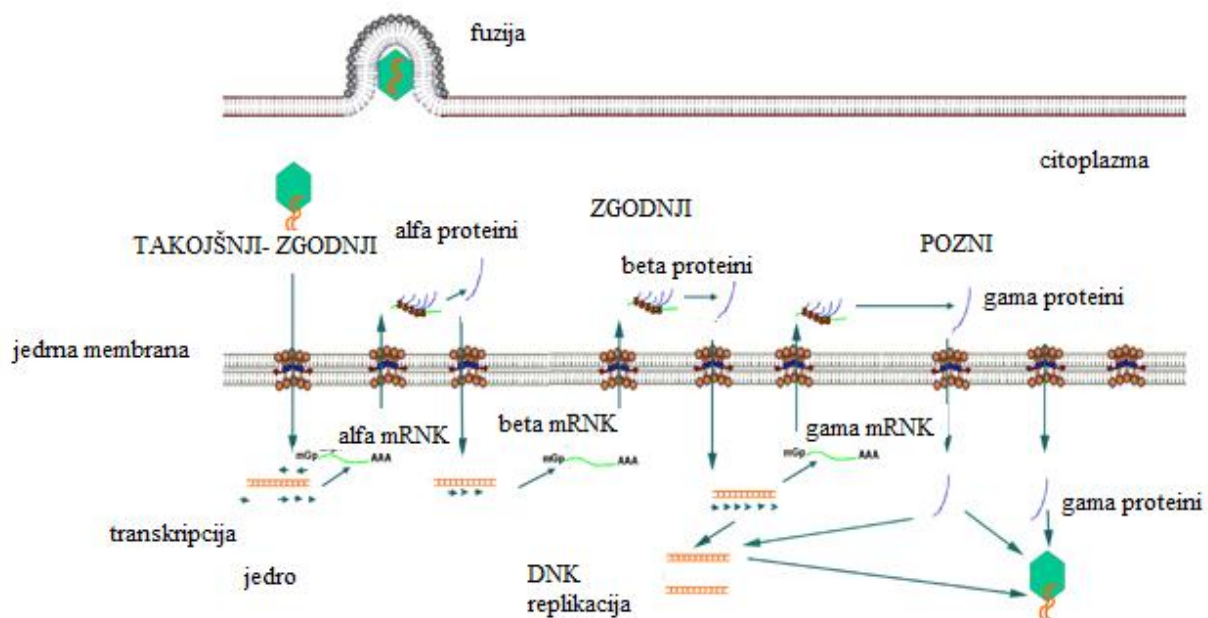
Slika 3: Odprti bralni okvirji restrikcijske mape BamH1 za latentne proteine.

1. 5. 1 Proteini latentne stopnje

V času latence se izraža le del genetske informacije iz latentnega genoma. Genom se ne vgradi v celično DNK, ampak se linearna oblika genoma zaokroži v episom, s kovalentnimi spojinami terminalno ponavljajočih elementov, ki se avtonomno podvaja. Večina proteinov se izrazi med aktivno stopnjo virusnega razmnoževalnega cikla, devet proteinov pa se izrazi le v latentno okuženih celicah. Genom nosi zapis tudi za dve mali RNK (EBERs), ki ne kodirata proteinov, vendar sta kljub nepoznani funkciji potrebni za vzdrževanje latentnega stanja(1,4).

V latentno okuženih celicah se izražajo EBV jedrni proteini- EBNA (ang. Epstein Barr nuclear antigen) in nekateri membranski proteini LMP (ang. Latent membrane protein). EB jedrne proteine (EBNAs) so prvič dokazali z antikomplementno imunofluorescenco v jedrih limfocitov B, ki so latentno okuženi z VEB (4). Identificirali so jih kot šest ločenih proteinov: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C in EBNA-LP (ang. leader protein), s skupno oznako EBNA 1-6, prevedenih iz dolge policitranske mRNK z alternativnim izrezovanjem (1).

Druga skupina latentnih proteinov so membranski proteini, ki imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju latence in izogibanju imunskemu odzivu. Glavno vlogo ima LMP1, ki je vpleten v vzpostavitev in širjenje nesmrtnosti limfocitov B, ter preprečitev celične apoptoze. Vpleten je v transformacijo in proliferacijo limfocitov B, prepreči pa lahko programirano celično smrt in zaradi delecije 30 bp poveča onkogenost virusa. LMP2A in LMP2B sta integralna membranska proteina, ki nastaneta z izrezovanjem odprtega bralnega okvirja oz. episoma. LMP2A zavira aktivacijo limfocitov B in tako omogoči celicam preživetje, virusu pa vzdrževanje latentnega razmnoževanja. Vloga LMP2B še ni poznana (5).



Slika 4: Prikaz transkripcije, translacije in replikacije DNK herpesvirusa.

1. 5. 2 Proteini litične stopnje

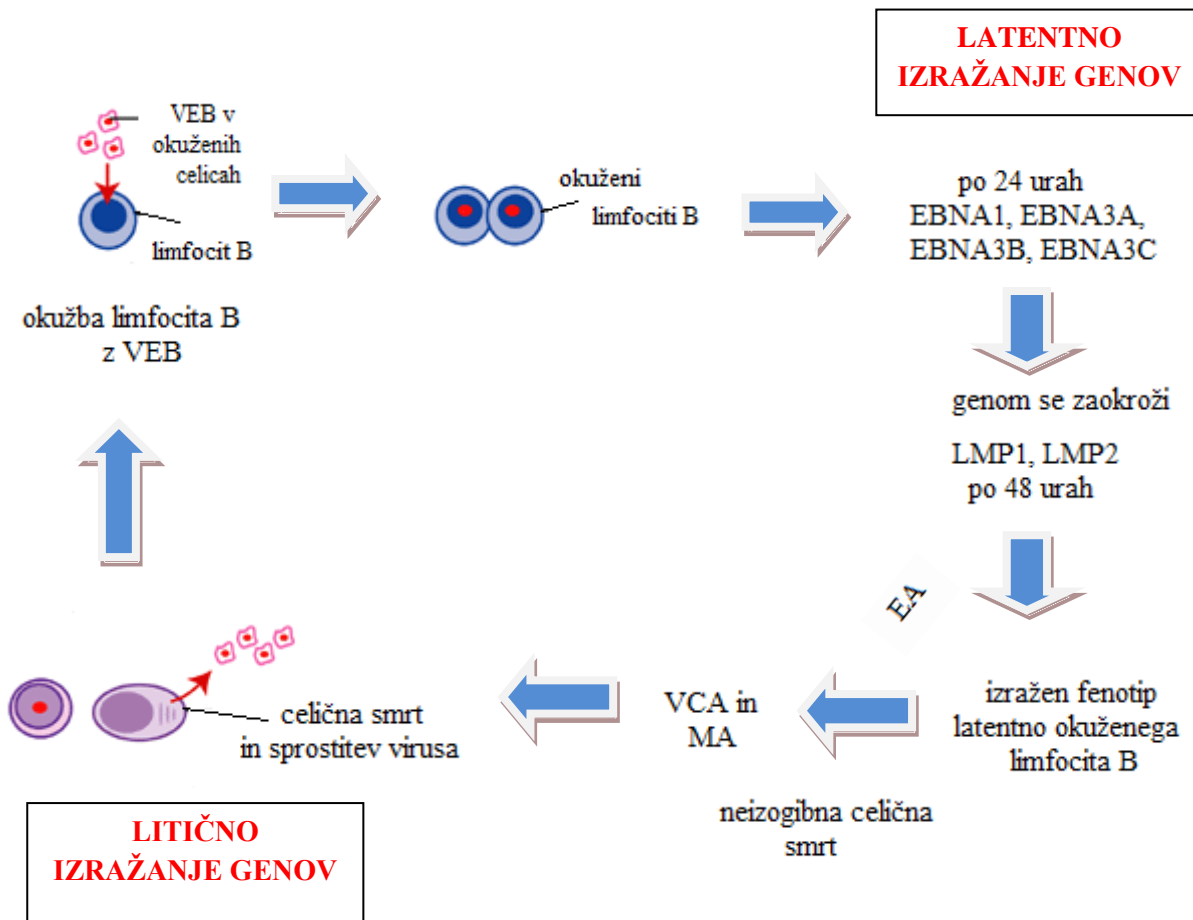
Geni litične okužbe se izražajo v času, ko se virus v celici pomnožuje in nastajajo novi virusni delci. Odražajo visoko homolognost z drugimi geni herpesvirusov. Prepisovanje litičnih genov poteka v štirih stopnjah. V prvi stopnji se izražajo takojšnji-zgodnji geni (zapis za alfa proteine) z vlogo regulatornih proteinov na prepisovanje zgodnjih genov (zapis za beta proteine) in poznih genov (zapis za gama proteine) (5).

Beta proteini so po funkciji encimi, ki omogočijo začetek podvojevanja virusne DNK (timidinska kinaza, ribonukleotidna reduktaza, DNK polimeraza, helikaza itd.) Gama proteini, pa so strukturne komponente virusne kapside (neglikolizirani proteini in glikoproteini), kamor se vstavi na novo sintetizirana virusna DNK. Prepisovanje litičnih genov poteka v treh časovnih zaporedjih. Vsako skupino proteinov aktivira predhodna skupina in jo ovira naslednja (5,6).

1. 5. 3 Vzpostavitev nesmrtnosti celice

Štiriindvajset ur po okužbi celic virus povzroči spodbuditev počivajočih limfocitov B k mitozii, poveča se velikost celičnega jedra, volumen citoplazme, ter izražanje CD23 antigenskega receptorja na površini limfocitov. Po 36 urah se sproži podvojevanje celične DNK in celična delitev. Vse to vodi v nesmrtnost celice, kjer igrata pomembno vlogo EBNA3A in EBNA3C. Nesmrtnost celice je trajna, saj se ob sprožitvi sinteze DNK celice neprestano delijo.

Prve virusne antigene (EBNA2 in EBNA-LP) v okuženih limfocitih B lahko dokažemo z detekcijo že 12 ur po okužbi. V naslednjih 24 urah pa lahko dokažemo še vse preostale jedrne antigene, medtem ko LMP1 dokažemo po 48 urah (6).



Slika 5: Shematski prikaz ekspresije genov VEB v odvisnosti od časa in dogodki v celici po infekciji, kot posledica ekspresije.

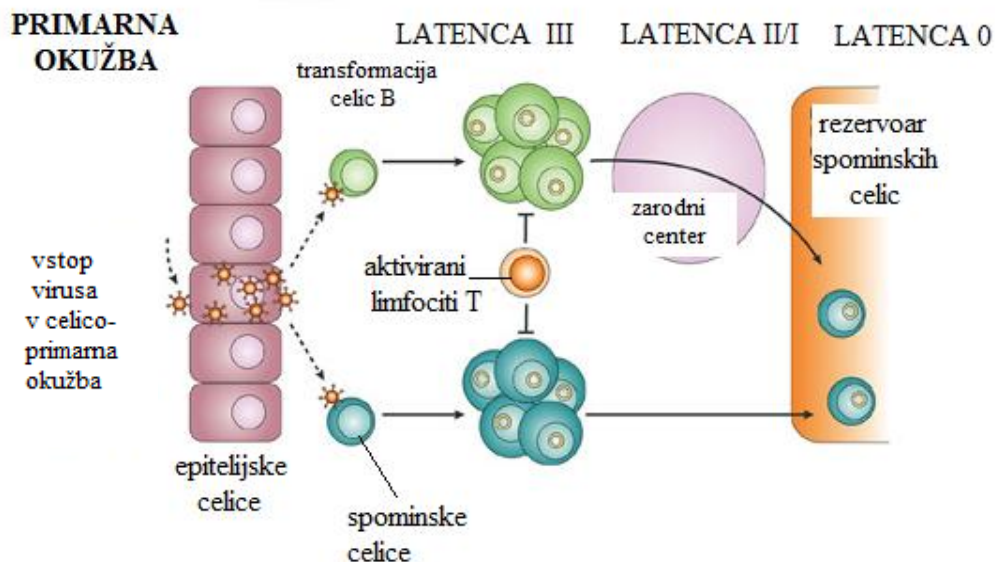
1. 6 PATOGENEZA VIRUSA EPSTEIN-BARR

Okužba z virusom Epstein Barr se lahko izide na tri načine:

- VEB se razmnožuje v belih krvnih celicah ali limfocitih B in v epiteljskih celicah žlezah slinavka, ki so dovzetne za okužbo z virusom.
- VEB po primarni okužbi vzpostavi latentno stanje v limfocitih B, kljub delujočim limfocitom T.
- VEB lahko stimulira rast limfocitov B in prepreči njihovo smrt.

Limfociti B predstavljajo poglavitni rezervoar latentnega virusa, čeprav lahko latentno okužbo zasledimo tudi v makrofagih, aktiviranih limfocitih T, dendritičnih celicah in v epiteljskih celicah pljuč (1).

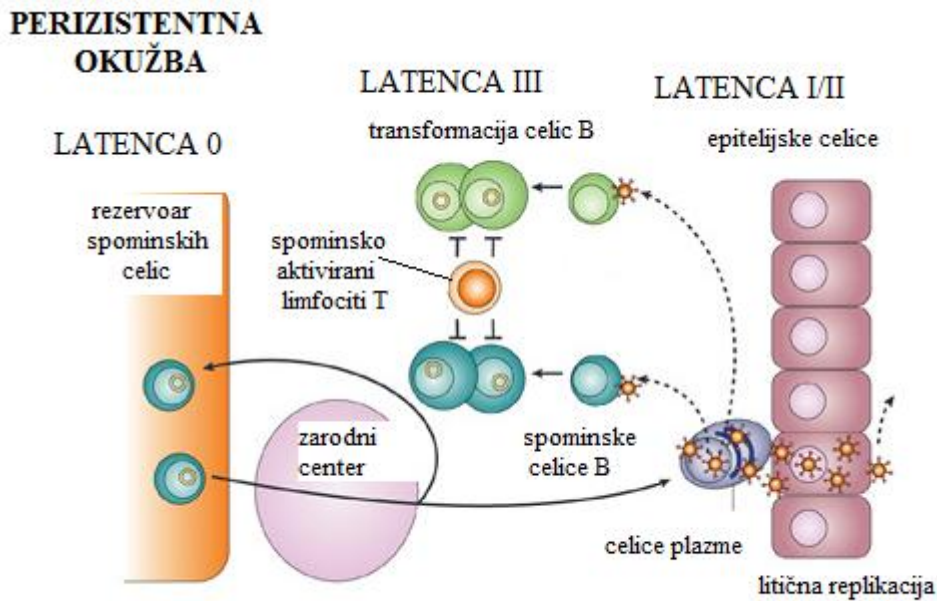
Pri okužbi epitelijskih celic, VEB okuži celice ustno-žrelnega prostora ali materničnega vratu. Veže se na receptor CD2. Po vstopu v celico se prične pomnoževati in iz celice se sproščajo novi virusi, ki okužijo ostale epitelijske celice ali najbližje limfocite B.



Slika 6: Shematski prikaz poteka primarne okužbe (stopnje latence).

Po vstopu virusa v gostitelja se okužba razvije v žlezah slinavkah, od koder se večina virusa sprosti v slino in tako prenese na druge ljudi. Okužba limfocitov B z virusom povzroči njihovo proliferacijo, ki jo kontrolira imunski sistem. V primeru nepravilnega imunskega odziva, so posamezniki podvrženi razvoju različnih oblik karcinoma.

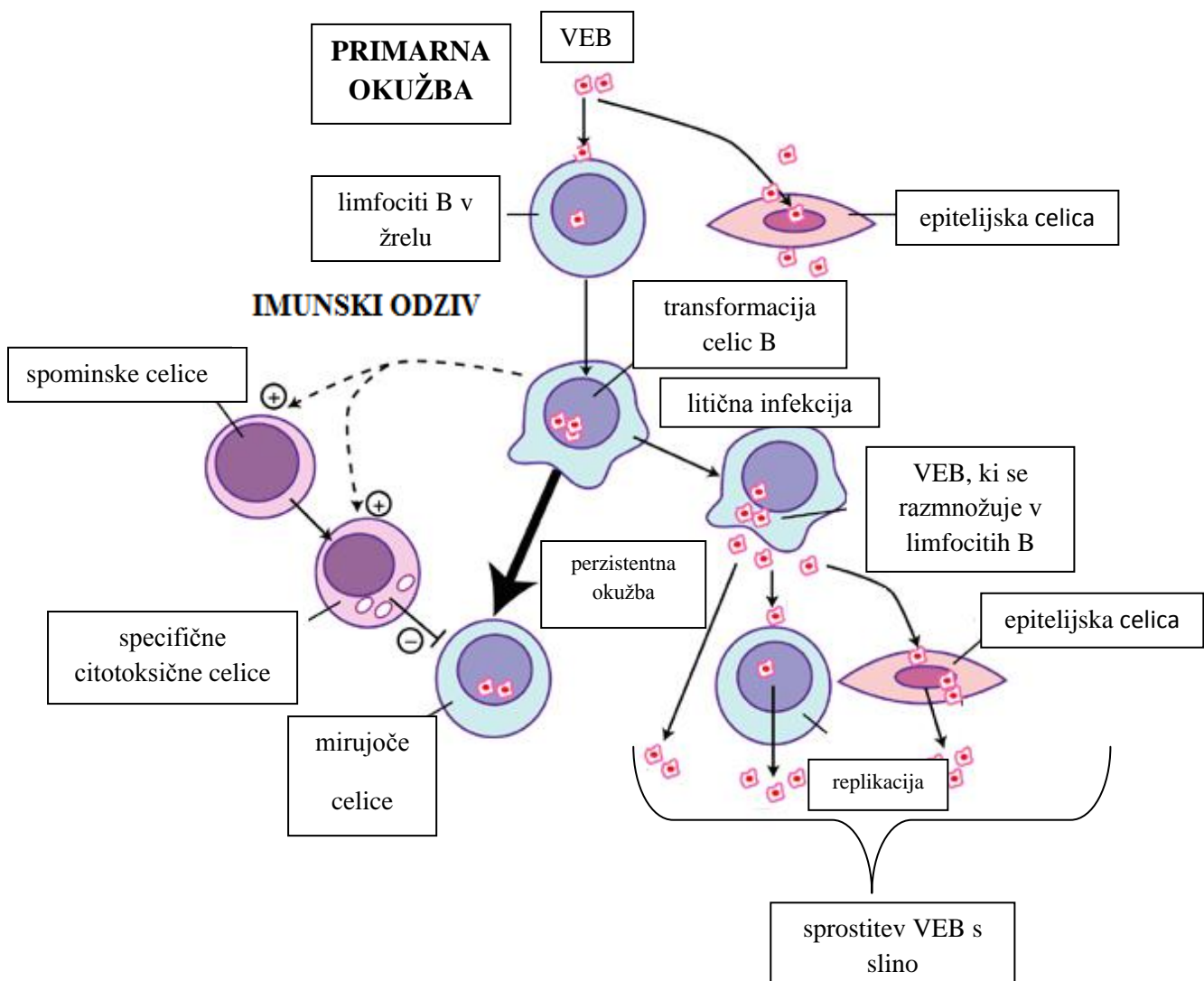
Po okužbi celic, lahko virus celice prisili da vstopijo v delitven cikel in v proliferacijo, pri čemer se sproščajo novi infektivni virusi, ki lahko okužijo še neokužene celice. Virus primarno vstopa v limfocite B preko specifičnih celičnih površinskih receptorjev CR2 oz. CD21, ki je hkrati tudi receptor za komponento komplekta C3d. Slednji se veže z glavnim površinskim glikoproteinom velikosti 350 kDa imenovanim gp350/220. Po vezavi na receptor virus vstopi v celico z zlitjem oz. fuzijo virusne ovojnice s celično membrano ali z endocitozo. Fuzijo omogoča kompleks glikoproteinov (gp85-gp25-gp42) (6,7).



Slika 7: Shematski prikaz poteka perizistentne okužbe (stopnje latence).

Virusna kapsida VEB se prenese do jedrne pore, skozi katero v jedro vstopi le virusna DNK. Genom virusa se v njem zaokroži in prevzame nadzor nad celično presnovo. Zaporedje dogodkov povzroči, da virus začne s prepisovanjem in izražanjem latentnih genov. Prva virusna antigena v okuženih limfocitih B sta jedra proteina EBNA-LP in EBNA2. Ker ima virus izražen antigen EBNA, ki ga imunski sistem ne zazna je virus v cirkulirajočih limfocitih B večinoma neviden.

Če se virus začne razmnoževati, okuži še več B limfocitov, pri katerih preide do sprememb v celičnem ciklu. Poleg omenjenih dveh antigenov se vključijo še ostali, ki celico prisilijo, da vstopi v G1 fazo celične delitve. Kasneje se iz genske informacije VEB prepíšejo še preostali latentni geni (EBNA1, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1 IN LMP2) (1,8).



Slika 8: Shematski prikaz okužbe limfocitov B z VEB (prirejeno po 14).

Izražanje latentnih genov pri VEB je možno na tri načine:

- latenca 1: izražajo se samo antigen EBNA1 (značilna za Burkittov limfom)
- latenca 2: izražajo se antigeni EBNA1, LMP1, LMP2A (značilni za Hodgkinov limfom in nosno-žrelni karcinom)
- latenca 3: izražajo se vsi latentni geni (opažen pri transformiranih celičnih linijah)

Latentno okužene celice na svoji površini nimajo kostimulativne molekule B7, ki je potrebna za aktivacijo citotoksičnih limfocitov T, zato je virus v okuženih limfocitih varen pred imunskim sistem. Celice, v katerih se nahaja virus se odzivajo na signale T limfocitov in se na podlagi teh usmerijo v eno izmed naslednjih stanj: mirujoče stanje, stanje terminalne diferenciacije ali apoptozo (1).

Posledica latentne okužbe je, da virus po primarni okužbi ostane v telesu. Z virusom okuženi limfociti B izražajo imunoglobuline in rastne dejavnike. V primeru nepravilnega izražanja latentnih genov ali motenega stanja latence v limfocitih B, se lahko virusi reaktivirajo in ponovno razmnožujejo, oziroma sprožijo začetek malignega spreminjanja, ki vodi v razvoj različnih oblik raka. Dejavniki reaktivacije pa so lahko kemične snovi, oslABLJena imunska odzivnost ali sočasna okužba z drugimi virusi (9).

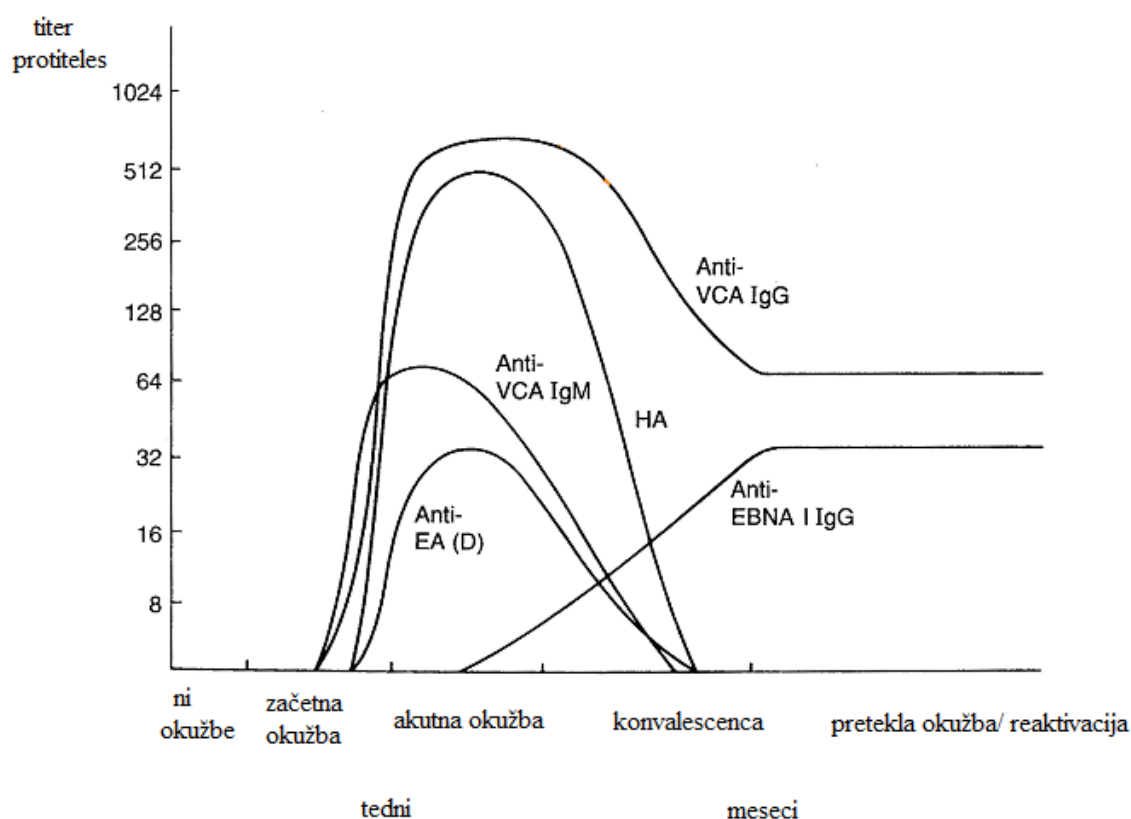
1. 7 IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO

1. 7. 1. Humoralni imunski odziv

Po okužbi z VEB se aktivirajo limfociti B, kar posledično vodi v sintezo različnih protiteles proti različnim virusnim antigenom (litičnim, latentnim antigenom in ligandom na virusni ovojnici), kot tudi proti drugim vrstam živalskih eritrocitov. Heterofilna protitelesa se v serumu bolnika v poteku obolenja pojavijo v 90 %, kot heterofilni aglutinini, ki aglutinirajo ovčje, goveje, konjske in druge eritrocite. Pojavijo se takoj na začetku obolenja ali kasneje (1).

Zelo pomemben je nastanek nevtralizirajočih protiteles (ang. complement-fixing antibodies) proti glikoproteinom virusne ovojnice gp350/220 in gp85, ki aglutinirajo virusne delce in s tem preprečijo nadaljnje širjenje virusa, ter posledično okužbe. Po primarni okužbi se tvori značilen vzorec protiteles.

S pojavom kliničnih znakov v serumu okuženih oseb najdemo protitelesa IgM proti VCA, redko IgA (slednja izginejo v nekaj dneh ali tednu dni, zato jih težko dokažemo, ob enem pa še ni prisotnih kliničnih znakov, ki bi lahko vzbudili sum na okužbo) IgG proti VCA, ter protitelesa IgG proti EA in membranskemu antigenskemu kompleksu. Protitelesa IgG proti EBNA se pojavijo pozno v poteku obolenja, prisotna pa ostanejo vse življenje (1,6).



Slika 9: Časovno pojavljanje protiteles po okužbi z VEB.

S pomočjo seroloških preiskav, ki jih uporabljamo za potrditev diagnoze okužbe z VEB, lahko na podlagi prisotnih protiteles določimo različne stopnje okužbe:

- Akutna okužba: je okužba z izraženimi kliničnimi znaki bolezni. Pri slednji pride do močnega porasta protiteles IgM proti VCA (IgM anti-VCA). Prisotna so na začetku obolenja, zasledimo pa jih še 4-8 tednov po okužbi. Po nekaj tednih jih nadomestijo protitelesa IgG proti iskanemu antigenu (IgG anti-VCA). Ta se ohranijo doživljenjsko. Pojav protiteles IgG proti zgodnjemu antigenu EA (IgG anti-EA) razreda D je pogosto zakasnel, vrh dosežejo po 4 tednih okužbe in izginejo po 3-6 mesecih. Protitelesa IgG proti EA, razreda R se lahko pojavijo več mesecev po začetku obolenja in jih lahko zasledimo do 3 let po obolenju. V obdobju akutne okužbe ni prisotnih protiteles proti EBNA (anti-EBNA1) (1,9).

- Med konvalescenca, oz. prebolevanjem bolezni koncentracija protiteles IgM anti-VCA in IgG anti-EA pade ali pa jo celo ne moremo določiti. Navzoča so protitelesa IgG anti-VCA. Med prebolevanjem IgG anti-EBNA1 še niso prisotna.
- Pri nedavni okužbi bolezenski znaki izginejo, serološko pa lahko ugotovimo, da od začetka okužbe ni minilo več kot 3 do 6 tednov. Navzoča so protitelesa IgG anti-VCA, včasih tudi IgG anti-EA.
- Pretekla okužba pomeni stik z virusom v preteklosti. Oseba nima izraženih kliničnih znakov (od okužbe je minilo več kot 6 tednov). Za to obdobje so značilna protitelesa anti-EBNA1 in visoka koncentracija protiteles IgG anti-VCA. Protiteles IgM anti-VCA in IgG anti-EA ni več.
- Sekundarna anti-EBNA negativnost je značilna za imunsko oslABLJENE bolnike (bolniki z limfomom, hepatitisom, pri bolnikih, ki se zdravijo z imunosupresivnimi zdravili, bolnikih okuženih s HIV in drugo), kjer titri IgG anti-VCA in IgG anti-EA porastejo nespecifično, protitelesa proti EBNA pa lahko izginejo. Ločimo med primarno in sekundarno anti-EBNA1 negativnostjo, ki ju določamo in razlikujemo z določanjem avidnosti protiteles IgG anti-VCA in IgG anti-EA. Sekundarni anti-EBNA1 negativnost lahko napačno interpretiramo kot primarno okužbo.
- Reaktivacija virusa poteka v prisotnosti ali brez bolezenskih znakov, večinoma poteka pri imunsko oslABLJENIH posameznikih. Za njo so značilni visoki titri protiteles proti litičnim antigenom IgG anti-VCA in IgG anti-EA.
- Heterofilna (nespecifična protitelesa) razreda IgM se v serumu bolnika v poteku obolenja pojavijo v 90%, kot heterofilni aglutinini, ki aglutinirajo ovčje, goveje, konjske, prašičje in druge eritrocite. Pojavijo se takoj na začetku obolenja ali kasneje. Čim kasneje se pojavijo, tem daljši je potek obolenja. Lahko so prisotni lažno pozitivni izvidi (redko), slednje pa zasledimo pri bolnikih z limfomom, hepatitisom ali zelo mladih ljudeh (1,9).

1. 7. 2 Celični imunski odziv

Mehanizmi celičnega imunskega odziva omejuje napredovanje virusa tako, da se klinični znaki okužbe običajno ne izrazijo. Že zelo zgodaj ob pojavu okužbe število okuženih celic močno naraste, pri tem pa je v okužbo vpletenih 20% limfocitov B. Najpomembnejša obramba proti okužbi z VEB so citotoksični limfociti T. Večina jih je CD8+ (supresorski/citotoksični limfociti), nekaj jih je naravnih celic ubijalk (CD16) in celic T pomagalk (CD4). V času okužbe v krvi število celic CD8+ močno naraste ($15 \times 10^9/L$). Tarča citotoksičnih limfocitov T so vse beljakovine EBNA in LMP, izjema je le EBNA1 (posledica sta bolezni: Burkittov limfom in karcinom nosno-žrelnega prostora). Ker limfociti T ne prepoznajo beljakovine EBNA1, posledično ne napadejo okuženih celic. Posledica učinkovitega delovanja limfocitov T je, da virus preide v latentno fazo (1).

1. 8 BOLEZNI, POVEZANE Z VEB

Virus Epstein Barr je povzročitelj številnih bolezni z izraženimi kliničnimi znaki, vendar pri nekaterih še niso odkrili, ali je neposredni povzročitelj bolezni ali zgolj spremljevalec. Med bolezni povezane z VEB je najbolj poznana klinična slika infekcijske mononukleoze, ki je odraz primarne okužbe, karcinom nosno-žrelnega prostora in Burkittov limfom (slika 11), ki se pojavita pri okuženih posameznikih, kot posledica maligno spremenjenih celic, ki so okužene z virusom. Burkittov limfom se pogosto pojavlja pri otrocih starih od 6-9 let na območju tropske Afrike in Nove Gvineje. Pogosteje so prizadete osebe moškega spola. V povezavi z VEB so poznane še limfoproliferativne motnje pri imunsko oslabljenih osebah, pri katerih imunosupresija omogoča, da se z virusom okužene celice nenadzorovano množijo (1).

Slika 10: Burkittov limfom pri sedemletnem dečku (tumor spodnje čeljusti) (1).



Preglednica II: Pregled bolezni povezanih z VEB.

Primarna VEB okužba	Reaktivacija VEB okužbe	Klinične oblike limfomov, povezane z VEB
<p>Asimptomatska Serokonverzija</p> <p>Infekcijska mononukleoza (IM)</p> <p>Primarna atipična VEB okužba</p> <p>Razjede na splovilih</p> <p>X- vezan limfoproliferativni sindrom</p>	<p>Limfoproliferativne nepravilnosti</p> <p>Intersticijski pneumonitis</p> <p>Ustna lasasata levkoplakija (OHL)</p> <p>Uveitis</p> <p>Ponavljajoči parotitis</p> <p>Limfomi pri bolnikih z AIDS-om</p>	<p>Burkittov limfom (BL)</p> <p>Karcinom nosno- žrelnega prostora (KNŽ)</p> <p>Hodkinov limfom (HL)</p> <p>T – celični limfom</p> <p>Imunoblastni B- celični limfom</p> <p>Limfoproliferativne bolezni po presaditvi organov in kostnega mozga (PTLD)</p>

1. 8. 1 INFEKCIJSKA MONONUKLEOZA (IM)

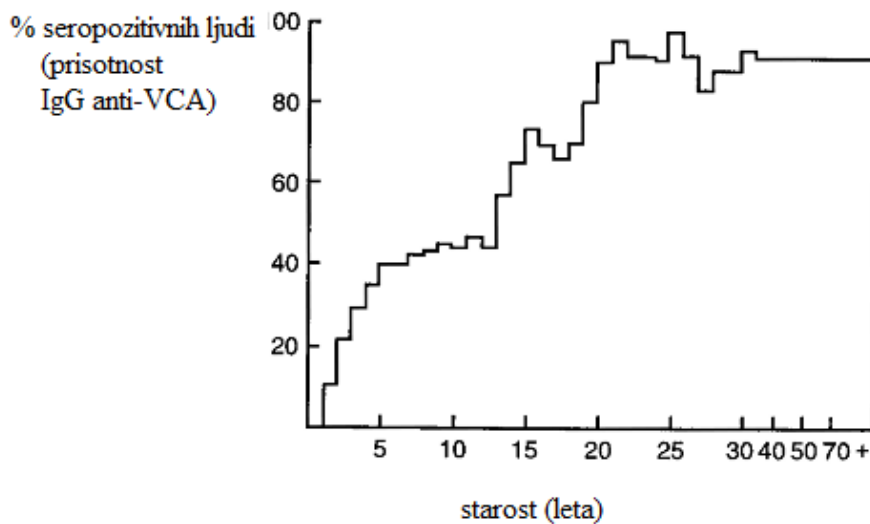
Infekcijska mononukleoza ali žlezna vročina (ang. glandular fever) je akutna samo-omejujoča limfoproliferativna bolezen (poznamo tudi kronično obliko bolezni). Za klasično akutno IM je značilno vnetje žrela, povišana telesna temperatura, ter povečane bezgavke. Pojavlja se kot posledica primarne okužbe, zlasti pri mladostnikih (starost 15-25 let), v zgodnjem otroštvu pa okužba večinoma poteka brez simptomov, saj klinično oboli manj kot 10 % otrok. Okužba po 40. letu starosti ima težji potek.

Bolezen je pogostejša v višjih socialno-ekonomskih razredih in v zahodnih deželah, ker so bili posamezniki zaščiteni pred okužbo v otroštvu. Glavna pot širjenja virusa poteka ob tesnih kontaktih preko sline (imenovana tudi bolezen poljuba; ang. kissing disease), možna je okužba s krvjo, najdba virusa v spolnih izločkih pa dopušča možnost spolnega prenosa.

Med boleznijo se poveča število belih krvnih celic v krvnem obtoku, od katerih prevladujejo limfociti. Mnogi limfociti so veliki 10-20 µm v dolžino in so netipičnih oblik (1,3).

1. 9 EPIDEMIOLOGIJA

Epidemiološke študije na osnovi seroloških izvidov kažejo, da pride do okužbe v starosti do 5 let že pri 50% populacije, v odrasli dobi pa je prekuženost ponekod celo 98 %. Do 25. leta starosti so skoraj vse odrasle osebe okužene z virusom in neobčutljive na nove okužbe, lahko pa pride do reaktivacije virusa. Čas primarne okužbe, ki večinoma poteka brez prepoznavnih bolezenskih znakov, je pogosto povezan z socialno ekonomskimi razmerami; čim slabše so, tem zgodnejša je primarna okužba. VEB je pogost v vseh predelih sveta. V seroepidemioloških študijah so glavni pokazatelj okužbe z VEB protitelesa IgG proti VCA, ker se pojavijo zgodaj po primarni okužbi in jih lahko zaznamo vse življenje (10).



Slika 11: Okuženost z VEB glede na starost (leta) (1).

1. 9. 1 Način prenosa virusa

Virus sprva okuži epitelne celice ustno-žrelnega prostora v katerih se razmnožuje, nato se lahko izloči v slino in z njo prenese na druge ljudi. Dokazano je bilo tudi občasno širjenje virusa z izločki zgornjih dihal še nekaj mesecev po okužbi. Prenos virusa je pogostejši pri otrocih v manj razvitih državah, v zgodnji nosečnosti in pri imunsko oslabljenih osebah. Pogosta oblika širjenja virusa je s slino zdravih oseb pri poljubljanju, zato je dobila vzdevek »kissing disease«, ali s kapljicami pri pokašljevanju.

Obstaja tudi možnost prenosa s spolnim stikom, manj pogosta pa je pot širjenja s transfuzijo, presaditvijo organov ali kostnega mozga. Nedavno so virus odkrili tudi v mleku doječih mater, kar predstavlja novo pot širjenja (1).

1. 9. 2 Razširjenost VEB v Sloveniji

V Sloveniji je bila narejena preiskava, kjer so tri leta zaporedoma (1985, 1986, 1987) določali stopnjo prekuženosti zdrave populacije z VEB. Določali so protitelesa IgG anti-VCA in ugotovili, da je 55% majhnih otrok prekuženih z VEB. Visok odstotek okužbe so ugotovili tudi pri odraslih po 30. letu (93%). Približno pri polovici bolnikov (53,2%) spremlja primarno okužbo sindrom IM, pri drugi polovici pa je klinična slika neznačilna in z drugimi bolezenskimi znaki (11,12).

1. 10 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB Z VEB

Raziskave so pokazale, da so postopki, ki se uporabljajo za diagnosticiranje okužbe z VEB in bolezi, ter sama interpretacija rezultatov odvisni od bolezi same in stopnje okužbe. Za dokazovanje okužb z VEB imamo na razpolago več diagnostičnih metod, s katerimi dokazujemo virus neposredno ali dokažemo okužbo na posreden način. Laboratorijska diagnostika je pomembna pri spoznavanju poti širjenja in obvladovanju virusnih okužb. Na podlagi slednjega lahko izoblikujemo zaščitne ukrepe, program cepljenja, spremljamo pojav epidemij, neznanih bolezi in novih virusov (2).

1. 10. 1 Neposredne metode za dokazovanje VEB

Neposreden dokaz virusov in virusnih antigenov je v današnjem času, ko lahko nekatere virusne bolezi zdravimo s protivirusnimi zdravili, zelo pomemben diagnostični postopek. Serologija ni primerna za dokazovanje virusa pri osebah po transplantaciji organov ali kostnega mozga, saj je njihov imunski sistem z zdravili namerno oslavljen. Takrat pridejo v uporabo neposredne diagnostične metode. Kljub temu, pa jih uporabljamo zelo redko zaradi sorazmerno visoke cene in zahtevnosti izvedbe testov.

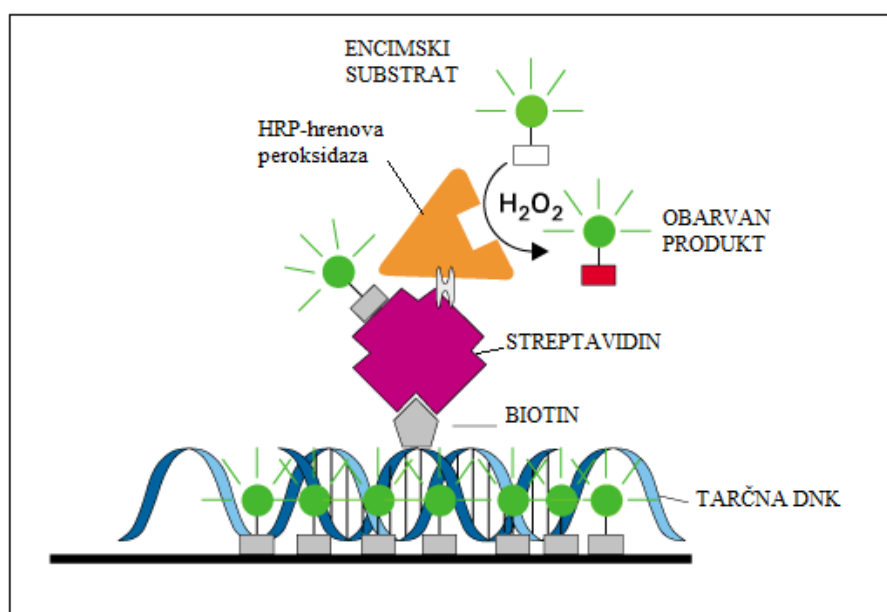
Virus lahko neposredno dokazujemo z dokazovanjem virusne DNK (molekularne-biološke metode: verižna reakcija s polimerazo oz. PCR, hibridizacija po Southernu in hibridizacija *in situ*), ter z dokazovanjem virusa v tkivih (histološki preparati-elektronska mikroskopija).

Poskus izolacije virusa iz kužnine je zahteven postopek, ki ga v diagnostične namene uporabljamo zelo redko. Predstavlja zahtevno delo, ki pa je največkrat brez koristi bolnika, saj 10-20% zdravih ljudi izloča virus s slino in nekaterimi izločki (13).

1. 10. 1. 1 Hibridizacija *in situ*

Hibridizacija *in situ* je hibridizacijska molekularna metoda s pomočjo katere lahko natančno ugotovimo in opredelimo določen del virusnega genoma. Denaturacija in hibridizacija poteka znotraj okuženih celic (*in situ*). Največkrat jo uporabljamo za dokazovanje virusov v celicah ali v tkivnih rezinah, ter za ugotavljanje lege virusnih mRNK. Diagnostični kompleti, ki se uporabljajo za izvedbo te metode vsebujejo z biotinom označene lovke, ki se vežejo na komplementarni del tarčne virusne DNK ali RNK. Biotin prikažemo z antibiotinskimi protitelesi, označenimi z encimi (alkalna fosfataza, hrenova peroksidaza). Na koncu dodamo encimski substrat, kjer se pri pozitivni reakciji odseki celice, iskana nukleotidna zaporedja (največkrat jedro) obarvajo, slednje pa opazujemo s svetlobnim mikroskopom (13).

Slika 12: Hibridizacija
in situ

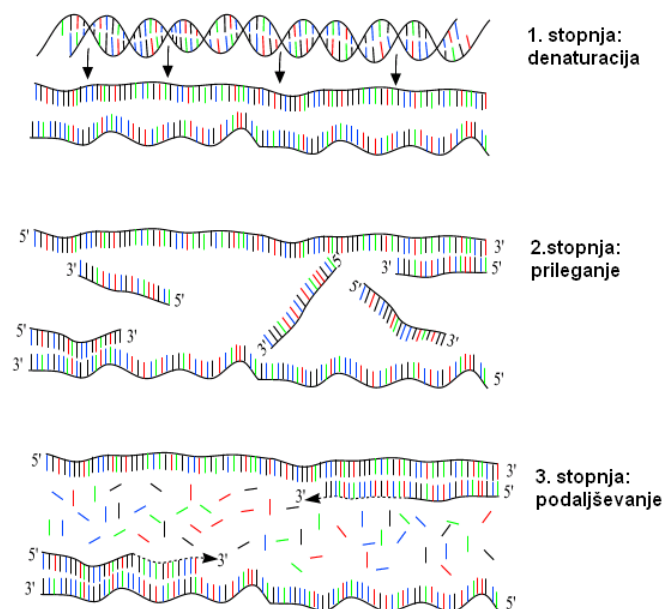


1. 10. 1. 2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo-PCR (ang. polymerase chain reaction) je metoda, ki se uporablja za pomnoževanje delcev nukleinskih kislin. PCR lahko pomnožuje le DNK, saj moramo RNK prepisati z reverzno transkriptazo v komplementarno DNK.

Potek PCR lahko v osnovi razdelimo na tri stopnje, ki se 30 do 40 krat ponovijo :

- dvovijačna DNK se denaturira in loči pri temperaturi nad 90 °C
- prileganje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50–60 °C
- podaljševanje verige pri temperaturi 70–78 °C. Podaljševanje verige poteka s pomočjo termostabilne polimeraze DNK (13).

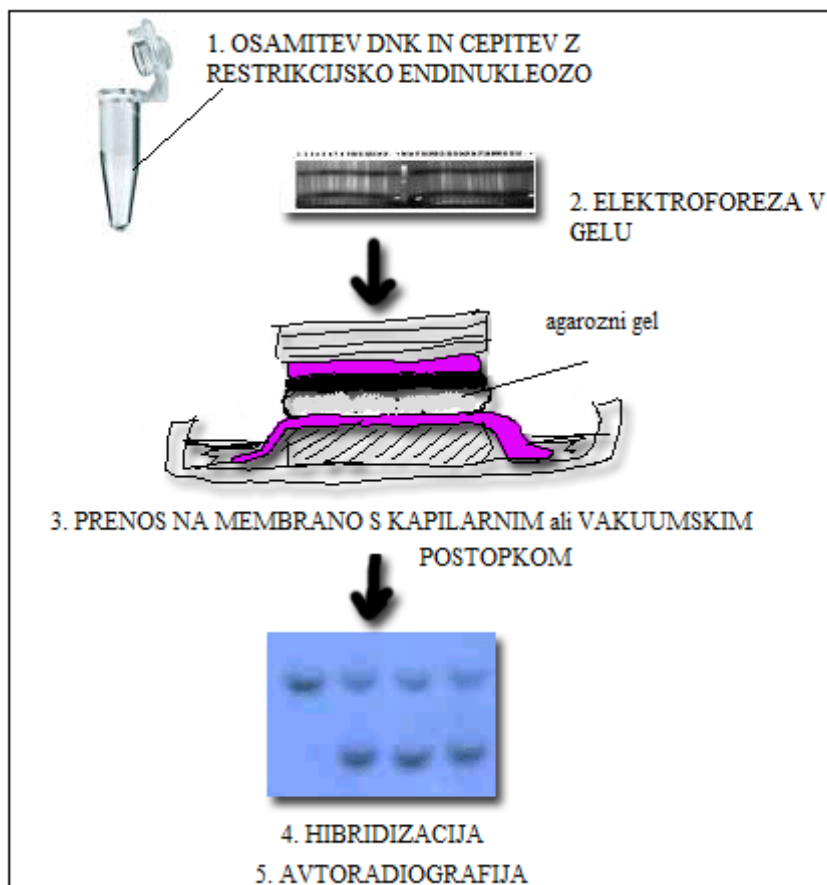


Slika 13: Shematski prikaz principa PCR.

1. 10. 1. 3 Hibridizacija po Southernu

Hibridizaciji po Southernu ali Southern blot (ang. blotting-odtis) je molekularna metoda s pomočjo katere dokazujemo in tipiziramo viruse z DNK. Z izbrano restrikcijsko endonukleazo razgradimo dvojnovijačno DNK na točno določenem mestu. Nastale odseke nato ločimo po velikosti z elektroforezo in jih nato prenesemo na membrano (najlonsko, nitrocelulozno) s kapilarnim ali vakuumskim postopkom. S posebno lovko (radioaktivna/neradioaktivna) in hibridizacijsko raztopino izvedemo hibridizacijo.

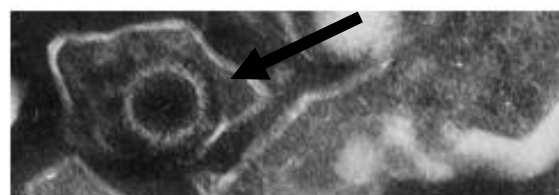
Lovka bo DNK hibridizirala le v primeru popolne skladnosti zaporedja nukleotidov, prebitek lovke pa odstranimo z večkratnim spiranjem membrane. Z avtoradiografijo nato ugotovimo položaj odsekov DNK (2,13).



Slika 14: Shematski prikaz hibridizacije po Southernu.

1. 10. 1. 4 Opazovanje virusov z elektronskim mikroskopom

Elektronska mikroskopija omogoča razlikovanje posameznih virusnih vrst med seboj, na podlagi morfoloških posebnosti. Na podlagi slednjih, lahko viruse uvrstimo v posamezno družino. Omogočila je opazovanje nekaterih virusov, ki jih ne moremo gojiti v celičnih kulturah in drugih sistemih. Največja omejitev elektronske mikroskopije je majhna občutljivost. Pri dokazovanju VEB z elektronsko mikroskopijo je opazovanje zelo omejeno, saj so si virusi družine Herpesviridae med seboj zelo podobni (slika 15) (2).



Slika 15: VEB z elektronskim mikroskopom.

1. 10. 2 Posredne metode za dokazovanje VEB

Virus v gostitelju izzove specifični imunski odziv, zato lahko prisotnost specifičnih protiteles različnih razredov izkoristimo za potrditev laboratorijske diagnoze okužbe z VEB. Pri tem posredno, z ugotavljanjem protiteles v serumu bolnika dokazujemo virusno okužbo. S posrednimi metodami pa lahko tudi potrdimo laboratorijsko diagnozo, ki smo jo postavili s kakšno izmed neposrednih metod. Kadar uporabljamo posredne tehnike za dokazovanje nedavne ali sveže okužbe z VEB je zelo pomembno, kdaj je bil serum (plazma) odvzet(a). Za smotrno diagnostično delo potrebujemo dva seruma (parna seruma). Prvega odvezamo, ko se pojavijo prvi bolezenski znaki na začetku bolezni (akutni serum), drugega pa praviloma dva do tri tedne kasneje (rekonvalescenti serum).

Princip različnih posrednih metod temelji na reakciji virusnih antigenov in specifičnih protiteles. Med posredne teste za dokazovanje VEB prištevamo: imunofluorescenčne teste (indirektna imunofluorescenca-IFA, antikomplementna imunofluorescenca-ACIF), encimsko imunske teste (ELISA), kemiluminiscenčni test (CLIA), imunska blot metoda ali western blot, multipleks imunske metode in Paul-Bunellova reakcija (13).

1. 10. 2. 1 Paul Bunellova reakcija

Paul-Bunellova reakcija je reakcija s katero dokazujemo prisotnost heterofilnih (nespecifičnih) protiteles razreda IgM. Heterofilna protitelesa aglutinirajo eritrocite različnih živalskih vrst. Včasih so se uporabljali pri diagnosticiranju infekcijske mononukleoze, danes pa jo nadomeščajo aglutinacijski testi »monospot«. Pri slednjih so na lateksne delce nanoseni hetero-antigeni, ki aglutinirajo. V primerjavi z ostalimi metodami, ki jih uporabljamo za dokazovanje okužbe z VEB gre za manj specifično in manj občutljivo metodo. Zaradi slednjega pri otrocih pogosto zabeležimo lažno negativen rezultat (13).

1. 10. 2. 2 Posredna imunofluorescenčna metoda-IFA (ang. immunofluorescent assay)

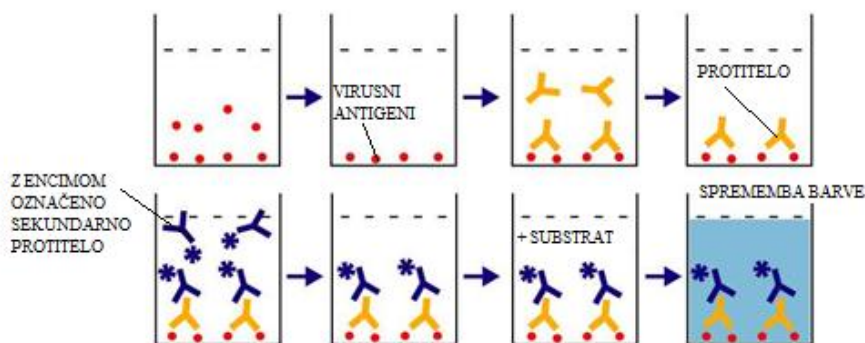
S posredno imunofluorescenčno imunske metodo dokazujemo specifična protitelesa v bolnikovem serumu. Specifična protitelesa iz bolnikovega seruma se najprej vežejo z virusnimi antigeni, ki so pritrjeni na predmetnik. Primarna protitelesa napravimo vidna, z dodatkom s fluorokromom označena sekundarna protitelesa (IgG ali IgM), ki prepoznajo primarna, bolnikova protitelesa (14).

Po vezavi nastane imunski kompleks (označeno sekundarno protitelo/primarno protitelo/virusni antigeni), ki ga opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. Rezultate testa izrazimo s titrom (koncentracijo) protiteles v preiskovanem vzorcu. Fluorokromi, ki se uporabljajo za boljšo vidnost so snovi, ki se aktivirajo pod vplivom svetlobe določene valovne dolžine in oddajo svetlobo druge valovne dolžine v vidnem delu spektra. Najbolj uporabljeni fluorescentni barvili sta fluorescein izotiocianat (FITC) in rodamin izotiocianat. Imunofluorescenčne metode so zelo visoko specifične, občutljive in hitre metode (15,16).

1. 10. 2 . 3 Encimsko imunska metoda

Encimsko imunska metoda-ELISA (ang. enzyme linked immunosorbent assay) je kvalitativni in kvantitativni test, ki je med serološkimi metodami najbolj uporaben diagnostični test. Je zelo visoko specifična in občutljiva metoda, kjer lahko določamo protitelesa ali antigene.

Pripravimo umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protiteles ali antigena, iz katere lahko nato odčitamo neznano koncentracijo v vzorcu. Pri dokazovanju virusnih okužb, se najpogosteje uporablja encimski test za dokaz protivirusnih protiteles (indirektna ELISA).



Slika 16: Encimsko imunski test (ELISA) za dokaz protivirusnih protiteles.

Reakcijo izvedemo tako, da virusni antigen vežemo na trden nosilec (polistirenska mikrotitracijska plošča z vdolbinicami) in dodamo bolnikov serum. Nastane kompleks antigena in serumskih protiteles, ki ga dokažemo tako, da dodamo sekundarna protitelesa označena z encimi (alkalna fosfataza, hrenova peroksidaza) (17).

Z vmesnim spiranjem odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. Na koncu dodamo ustrezní substrat za encim, ki omogoči spremembo barve substrata in tako detekcijo preiskovanega protitelesa. Izmerjena absorbanca je sorazmerna s količino produkta, količino vezanih sekundarnih protiteles, ter količino vezanih primarnih protiteles, katerih količino v vzorcu določamo (15).

1. 10. 2. 4 Imunska blot metoda (test Western blot, test imunoblot)

Imunska blot metoda spada med imunske tehnike in temelji na dokazovanju specifičnih protiteles, usmerjenih proti posameznim virusnim beljakovinom. Virusne beljakovine so rekombinantne beljakovine, ki jih predhodno določimo z elektroforezo v poliakrilamidnem gelu in jih nato prenesemo na nitrocelulozno membrano.

Test izvedemo tako, da membrano z virusnimi antigeni inkubiramo z bolnikovim serumom, spiramo, ter dodamo z encimom označena protitelesa, ki so usmerjena proti človeškim imunoglobulinom. Na koncu dodamo substrat.

Pri pozitivni reakciji po obarvanju posameznih mest (pasov) ugotovimo, s katerimi virusni antigeni so reagirala protitelesa v bolnikovem serumu. Čim večje je število antigenov, ki jih prepoznajo protitelesa iz bolnikovega seruma, večja je verjetnost, da smo okužbo z določenim virusom dokazali (19).

1. 11 KEMILUMINISCENČNA IMUNSKA METODA (CLIA)

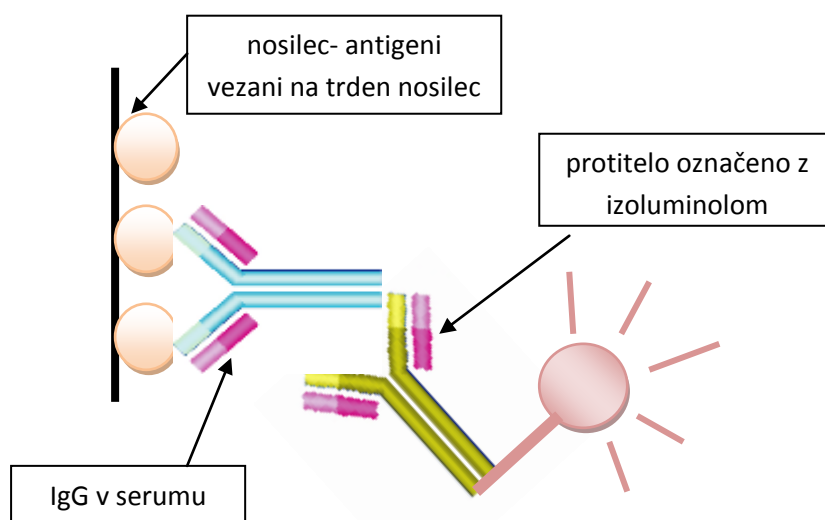
Kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA; ang. chemiluminescence immunoassay) je metoda, ki je v osnovi zelo podobna encimski imunski metodi (ELISA). Metoda je pogosto uporabljena v rutinski laboratorijski diagnostiki za kvantitativno določanje specifičnih protiteles, pri okužbi z VEB: IgM VCA, IgG VCA, IgG EBNA in IgG EA v serumu ali plazmi preiskovancev.

Protitelesa dokažemo v kompleksu na katerega je konjugiran derivat izoluminola. Kot trdo fazo se uporabljajo magnetne kroglice, na katere so vezani peptid p18 za določitev IgG anti-VCA, p18 za določitev IgM anti-VCA, EBNA-1 za določitev IgG anti-EBNA in rekombinantni polipeptid EA-D za določitev IgG anti-EA. Sintetični peptidi in rekombinantni polipeptidi so analogi nativnih virusnih antigenov (20).

Metoda temelji na dejstvu, da se protitelesa iz seruma vežejo na antigene oz. kroglice. Vezana protitelesa pa dokažemo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, usmerjenim proti človeškemu imunoglobulinom, na katere je konjugiran izoluminolni derivat.

Če pride do vezave konjugata na prvi kompleks, se po dodatku posebnega reagenta (vzpodbujevalnega reagenta), ki vsebuje vodikov peroksid (H_2O_2) in encim peroksidazo sprosti svetlobni signal, ki ga fotopomnoževalka izmeri kot relative luminiscenčne enote (RLU; ang. relative luminiscence units). Te so sorazmerne s koncentracijo specifičnih protiteles proti VEB v preiskovanih vzorcih, kalibratorjih in kontrolah (21).

Izoluminol iz osnovnega energijskega stanja spravimo v stanje povečane energije z dodajanjem peroksidaze, ki peroksid pretvori v vodo (H_2O) in posledično povzroči oksidacijo izoluminola. Preko intermedijatorjev prehaja izoluminol v osnovno obliko, pri čemer oddaja svetlobo v obliki kemiluminiscence. V reakciji se sprošča svetlobna energija, ki jo merimo pri 425 nm. Označevalci so lahko še luminol in luciferin (22).



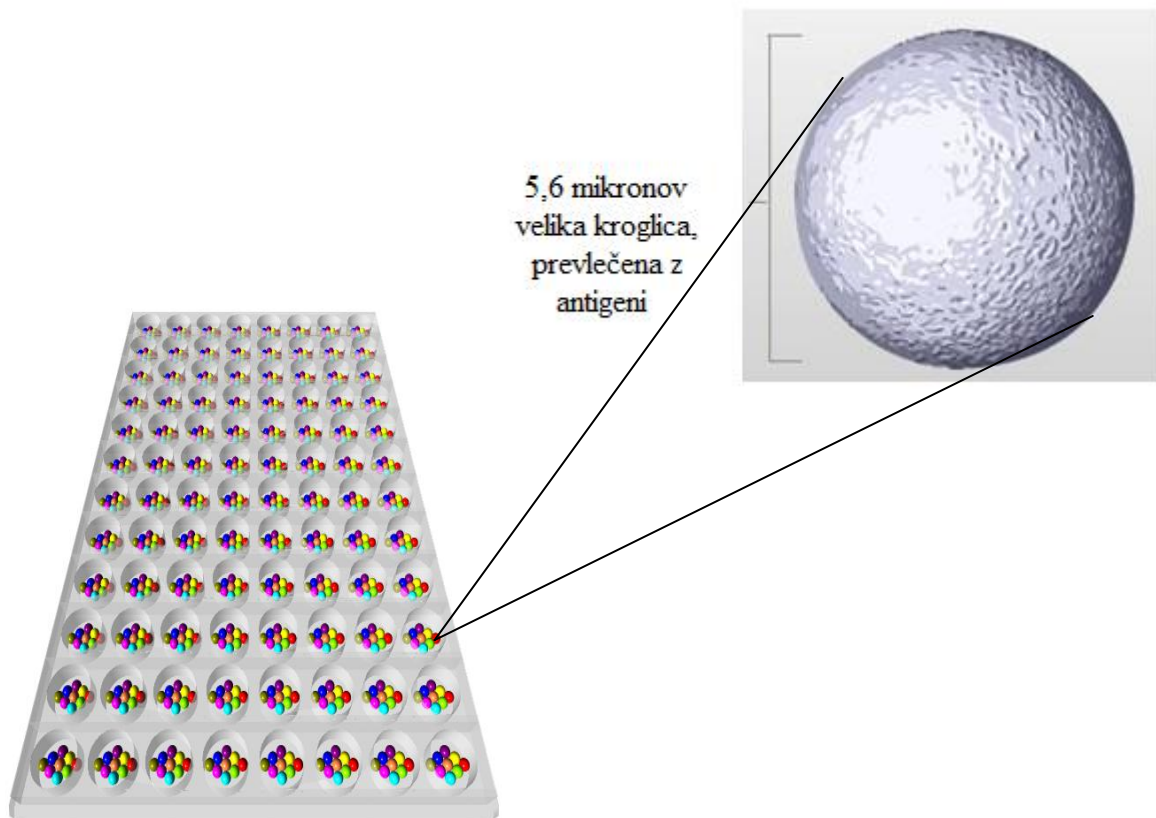
Slika 17: Shematski prikaz imunskega kompleksa z metodo CLIA.

1. 12 xMAP TEHNOLOGIJA ZA DOKAZOVANJE PROTITELES

Moderne multipleks metode se poleg dokazovanja ostalih virusnih povzročiteljev uporabljajo za kvantitativno določanje specifičnih ali nespecifičnih protiteles, proti različnim antigenom VEB. Na trgu poleg ročnih metod obstajajo tudi avtomatizirane metode, ki zmanjšajo možnost napake in hitrost pri sami izvedbi testa.

Multipleks metode za določanje VEB temeljijo na uporabi 5,6 mikronskih- polistirenskih kroglic (ang. antigen beads), ki so prevlečene z različnimi rekombinantnimi antigeni. V suspenziji polistirenskih kroglic se nahajajo kroglice, prevlečene z antigeni: VCA (virusni kapsidni antigen), EBNA (Epstein Barr jedrni antigen), ter EA (zgodnji antigen). Uporabljajo se za določanje specifičnih protiteles pri diagnosticiranju okužbe z VEB.

Sistemi določenih proizvajalcev pa omogočajo tudi določanje nespecifičnih heterofilnih protiteles razreda IgM v bolnikovem serumu (23).



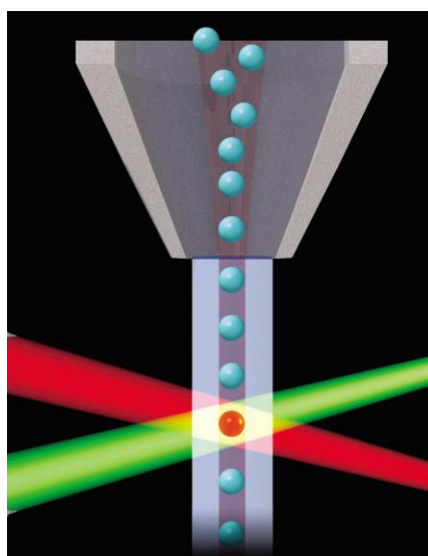
Slika 18: Prikaz testne plošče s kroglično raztopino in velikostjo kroglic v raztopini.

Kroglice poleg antigenov vsebujejo tudi rdeče in infrardeče fluorokrome v različnih razmerjih, ki služijo detekciji z laserjem. Ker vsebujejo fluorokrome v različnih razmerjih, omogočajo sočasno določanje do sto različnih analitov. Fluorokromi so zelo občutljivi na svetlobo, zato moramo med samo izvedbo testa paziti, da reagentov in testne plošče pretirano, ne izpostavljammo svetlobi (24).

Na ustrezno filtrirno ploščo z vdolbinicami naneseemo ustrezno redčene serume, ter dodamo raztopino kroglic, prevlečenih z ustreznimi antigeni. V času inkubacije sledi vezava specifičnih protiteles razreda IgM in IgG, ter heterofilnih protiteles. Slednja v naslednji stopnji reagirajo z dodatkom konjugata.

Konjugat je raztopina gosjih monoklonskih protiteles razredov IgG in IgM, usmerjenih proti človeškim IgG in IgM, ter konjugiranimi z fikoeritriinom-PE (ang. phycoerythrin).

Po inkubaciji in poteku reakcije sledi merjenje signala fluorescence, kar nam omogoča za to kalibriran ustrezni analizator (Luminex xMAP® System). Laserska žarka (rdeči in zeleni) v analizatorju sekata pot. Rdeči žarek razvršča kroglice na podlagi rdečih in infrardečih fluorokromov in jih razvrsti v 100 nizov. Zeleni žarek, pa vzpodbudi oranžno fluorescenco, ki je odvisna od predhodne vezave s fikoeritriinom. Za vsak antigen, aparat analizira 100 kroglic, ki jih nato na podlagi barve opredeli in poda številčni rezultat pripadajočemu protitelesu proti VEB (25,26).



Slika 19: Prikaz potovanja dveh laserskih žarkov v analizatorju.

2 NAMEN DELA

Večina okužb z virusom Epstein Barr temelji na prepoznavnih kliničnih znakih, kljub temu pa je potrebna tudi laboratorijska diagnostika. Razvoj tehnologije laboratorijskih metod s katerimi dokazujemo okužbe je v hitrem vzponu, saj stremijo k avtomatizaciji in naprednosti. Ena izmed takšnih metod, je tudi moderna multipleks metoda, ki temelji na uporabi fluorescentnih barvil.

Namen diplomske naloge je ugotoviti serološki odziv preiskovancev, okuženih z virusom Epstein Barr z modernima multipleks metodama, dveh različnih diagnostičnih kompletov Focus Diagnostics in Zeus Scientific. Rezultate slednjih bomo primerjali s kemiluminiscenčno imunsko metodo sistema Liaison, ki se vsakodnevno uporablja v rutinski diagnostiki. Najprej bomo z multipleks metodama določili serološki status skupine preiskovancev, ter metodi primerjali med seboj. Nato bomo rezultate primerjali s kemiluminiscenčno metodo, ter ovrednotili diagnostično uporabnost (ujemanje, specifičnost in občutljivost).

Naš cilj je ugotoviti, ali daje kemiluminiscenčna metoda primerljive rezultate v primerjavi z modernima multipleks metodama in ovrednotiti, katera metoda ima večjo diagnostično vrednost. Glede na kvaliteto pridobljenih rezultatov, bi lahko v prihodnosti z optimizacijo multipleks metode, slednjo uvedli v rutinsko diagnostiko.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili 150 zaporednih vzorcev (serumov) bolnikov s sumom na okužbo z VEB, ki smo jih izbrali iz rutinske dejavnosti Laboratorija za diagnostiko virusnih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Zaradi suma na okužbo z VEB so bili vzorci v maju, juniju in juliju 2009 poslani v redno laboratorijsko diagnostiko. Rezultati rutinskih analiz so hranjeni v laboratorijskem informacijskem sistemu.

Vsi vzorci so bili do našega testiranja shranjeni v zamrzovalniku pri -20°C v zaprtih plastičnih epruvetah in deloma tudi v hladilniku pri temperaturi $2-8^{\circ}\text{C}$. Vzorce smo pred uporabo odmrznili pri sobni temperaturi in jih previdno premešali.

Raziskavo smo predložili v oceno Komisiji Republike Slovenije za medicinsko etiko, ki jo je obravnavala na svoji seji 28.07.2009 in odobrila izvedbo raziskave.

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA IN REAGENTI

Za izvedbo multipleks metod smo potrebovali analizatorski sistem Luminex xMAP[®] (Austin, Texas, ZDA) in komercialno pripravljene komplete dveh različnih ameriških proizvajalcev: Focus Diagnostics (Plexus[™], EBV IgG in IgM Multi-Analyte Diagnostics) in Zeus Scientific (AtheNA Multi-Lyte[®], EBV IgG in IgM Test System), za določitev posamezne vrste protiteles.

Komercialno pripravljen diagnostični komplet obeh proizvajalcev vsebuje reagente in pripomočke za izvedbo 96 testov. Kompleti vsebujejo:

- suspenzijo polistirenskih kroglic
 - prevlečene z rekombinantnimi antigeni VCA, EA-D in EBNA-1 za določanje protiteles razreda IgG
 - prevlečene z rekombinantnimi antigeni VCA za določanje protiteles razreda IgM in heterofilnimi antigeni (samo Focus Diagnostics)
- konjugat: gosja monoklonska protitelesa IgG in IgM usmerjena proti človeškim IgG in IgM, konjugirana s fikoeritriinom-PE (ang. phycoerythrin)

- kalibrator za IgG in IgM
- negativna kontrola za IgG in IgM
- pozitivna kontrola za IgG in IgM
- razredčevalni pufer za IgG in IgM
- mikrotitracijska filtrirna plošča z 12 stolpci, v vsakem je 8 vdolbinic (96 vdolbinic)
- 10 x izpiralni pufer za IgG in IgM



Slika 20: Diagnostični komplet Plexus™ proizvajalca Focus Diagnostics.

Z enim diagnostičnim kompletom obeh proizvajalcev smo določili tri vrste protiteles razreda IgG: VCA IgG, EBNA IgG, EA IgG. Medtem, ko smo z drugim določili protitelesa razreda IgM: VCA IgM in heterofilna protitelesa pri diagnostičnem kompletu Plexus, proizvajalca Focus Diagnostics.

Ostali material za izvedbo testa:

- avtomatske pipete in plastični nastavki različnih volumnov
- večkanalne pipete in plastični nastavki
- epruvetke za pripravo razredčin
- stojalo za epruvete
- testne plošče z 96 vdolbinicami za pripravo razredčin
- mešalo vorteks
- stresalnik
- vakuumška črpalka z zbirnikom za odpad in filtrirnim podstavkom
- ultrazvočna kadička

- štoparica
- destilirana voda
- prazne stekleničke za pripravo izpiralnega pufra

Vse reagente smo do predpisanega datuma uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Pred uporabo smo jih ogreli na sobno temperaturo in dobro premešali, po potrebi sonificirali v ultrazvočni kadički (predvsem suspenzijo polistirenskih kroglic). Po uporabi smo vse uporabljene reagente in pripomočke varno zavrgli.

Med samo izvedbo testa smo upoštevali vse varnostne predpise in navodila za delo v mikrobiološkem laboratoriju in se ustrezno zaščitili z zaščitnimi in dezinfekcijskimi sredstvi.

3. 2. 1 Priprava vzorcev

Pred začetkom testa smo v epruvetke in testne plošče pripravili ustrezne redčine serumov preiskovancev z razredčevalnim sredstvom protiteles razreda IgM in IgG. Pri uporabi diagnostičnega kompleta Focus Diagnostics smo serume redčili v razmerju 1:51, pri Zeus Scientific pa v razmerju 1:21. V obeh primerih smo porabili 10 µl seruma. Pripravljene redčine smo dobro premešali.

3. 2. 2 Priprava izpiralnega pufra (1x wash)

Diagnostični komplet vsebuje 50 ml 10x izpiralnega pufra (10x wash), ki smo ga razredčili z 450 ml destilirane vode in pripravili 1x izpiralni pufer. Za vsak diagnostični komplet smo pripravili novo raztopino pufra. Pripravljeno razredčino smo dobro premešali in jo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8°C. Tako hranjen pufer je stabilen 30 dni.

3. 2. 3 Predpriprava suspenzije polistirenskih kroglic

Suspenzijo polistirenskih kroglic smo neposredno pred uporabo dobro premešali na mešalu (30 s), nato pa stekleničko potopili v ultrazvočno kadičko z vodo, kjer smo jo sonificirali (30 s). Stekleničko smo po uporabi vedno zaprli, saj je suspenzija občutljiva na svetlobo.

Pred izvedbo testa smo vse reagente in vzorce ogreli pri sobni temperaturi (20-25°) in jih narahlo premešali.

3. 3 METODE DELA

V okviru diplomske naloge smo primerjali tri diagnostične komplete reagentov dveh diagnostičnih sistemov, za dokaz specifičnih protiteles proti VEB. Rezultate, ki so jih določili med rutinskim diagnostičnim testiranjem z metodo, ki temelji na kemiluminiscenci (sistem Liaison, DiaSorin, Italija) smo primerjali z rezultati, ki smo jih pridobili sami s testiranjem istih vzorcev na sistemu Luminex (Austin, Texas, ZDA), ki temelji na merjenju fluorescence. Pri tem smo uporabili diagnostična kompleta dveh različnih proizvajalcev (Focus Diagnostics, Plexus[™], ZDA in Zeus Scientific, AtheNA Multi-Lyte[®], ZDA). Z aparatom smo upravljali v skladu z navodili proizvajalca.

3. 3. 1 Kemiluminiscenčna imunska metoda (CLIA)

To metodo bomo opisali zgoščeno, saj smo le uporabili rezultate, da smo lahko primerjali vse tri metode in jih statistično ovrednotili.

Diagnostični sistem Liaison, omogoča izvajanje imunskih testov, ki temeljijo na kemiluminiscenci. Za določanje protiteles proti VEB uporabljajo štiri različne diagnostične komplete, za vsako posamezno protitelo (Liaison[®] VCA IgG, Liaison[®] VCA IgM, Liaison[®] EBNA IgG, Liaison[®] EA IgG).

Pri testu se uporabljajo magnetni delci (trda faza), na katere so vezani sintetični peptidi za določanje protiteles proti VEB in mišja monoklonska protitelesa, ki so povezana z derivatom izoluminola. Med prvo inkubacijo se protitelesa v vzorcih, kalibratorjih in kontrolah vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo pa konjugat reagira s protitelesi, vezanimi na trdno fazo.

Po vsaki inkubaciji je nevezan material odstranjen s spiranjem z izpiralnim pufrom. V zadnji stopnji se dodajo vzpodbujevalni reagenti, ki povzročijo reakcijo in posledično oddajanje kemiluminiscenčne svetlobe, katero zazna fotopomnoževalka v relativnih svetlobnih enotah-RLU (ang.: relative luminiscence units) in je sorazmerna količini protiteles proti VEB v preiskovanih vzorcih, kalibratorjih in kontrolah.

Za posamezni test potrebujemo 20 µl vzorca, od vstavitve slednjih do prvih rezultatov pa preteče 35 minut. Delovanje aparata je popolno avtomatizirano. Aparat istočasno omogoča izvedbo 15 različnih testov za dokaz protiteles proti drugim mikroorganizmom v zelo kratkem času. Sočasno lahko testira 120 vzorcev, ki so vstavljeni v 12 nosilcev z 10 odprtini.

V času ene ure lahko izvede do 180 meritev. Analizator samodejno ohlaja reagente, nadzoruje količino reagentov, oz. število testov, ki jih lahko z integralnim reagentom še izvede, odčitava kode vstavljenih vzorcev in ostalih reagentov, redči vzorce in reagente, vključuje avtomatsko kalibracijo dnevno in na 2-6 tednov, ter vzdržuje temperaturo celotnega sistema.

3. 3. 2 Multipleks metoda za določanje protiteles proti VEB

Multipleks imunsko metodo smo izvedli na analizatorskem sistemu Luminex, kjer smo uporabili diagnostični komplet proizvajalca Focus Diagnostics. Analizator je pri tem uporabljal program Plexus™, s pomočjo katerega je ovrednotil rezultate, ki jih je Luminex izmeril. Pri izvedbi drugega testa, kjer smo uporabili diagnostični komplet proizvajalca Zeus Scientific, je bil slednji povezan s programom AtheNA Multi- Lyte. Pred začetkom merjenja, smo analizator skalibrirali z ustreznimi kalibratorji. Za posamezni test smo potrebovali 10 µl vzorca. Aparat Luminex je za analizo enega vzorca potreboval približno 25-30 sekund, da je izmeril fluorescenco v posamezni vdolbinici. To pomeni, da je celotno ploščo (96 vdolbinic) izmeril v približno 40-48 minutah.

Z obema diagnostičnima kompletoma smo določali specifična protitelesa proti virusu Epstein Barr: VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG in EA IgG. Pri proizvajalcu Focus Diagnostics smo hkrati s specifičnimi protitelesi določali tudi prisotnost heterofilnih protiteles IgM, ki so nam pomagala pri opredelitvi stadija okužbe z VEB.

V računalnik smo vnesli vse potrebne podatke (vrsta testa, referenčno številko diagnostičnega kompleta (LOT), številke serumov,...). S pritiskom na ustrezni ukaz je računalnik sam izbral ustrezno lokacijo in število kontrol (pozitivna, negativna) in kalibratorjev, ali pa smo lokacije vnesli ročno.

Pri diagnostičnemu kompletu Plexus smo uporabili: za kromogen/substrat- slepa (ang. blank), negativno in pozitivno kontrolo po eno vdolbinico, ter po tri vdolbinice za kalibrator enakih koncentracij, ostale vdolbinice so bile namenjene preiskovanim vzorcem. Pri kompletu AtheNA pa smo uporabili dve vdolbinice, eno za pozitivno in eno za negativno kontrolo, ostale pa so bile namenjene vzorcem.

3. 3. 2. 1 Princip testa

Celotna izvedba testa do merjenja fluorescence je bila ročna. Test je pri obeh diagnostičnih kompletih potekal v treh stopnjah:

1. Na ustreznih testnih ploščah in v epruvtkah smo pripravili redčine serumov v predpisanem razmerju, ter jih prenesli na mikrotitracijsko-filtrirno ploščo, kjer je potekla inkubacija z dodano raztopino kroglic antigenov. Če so bila v serumu protitelesa je potekla vezava na površino kroglic.
2. V naslednji stopnji smo testno ploščico s pomočjo vakuumske črpalke spirali z izpiralnim pufrom. Nato smo dodali konjugat. Med inkubacijo je konjugat reagiral s protitelesi, vezanimi na antigenske kroglice. Nastal je kompleks v obliki sendviča (antigen:protitelo:konjugat). Pred merjenjem smo mikrotitrsko ploščico stresali na stresalniku, da ne bi prišlo do posedanja kroglic v antigenski suspenziji. Mikrotitrsko plošča je bila med stresanjem pokrita z alu folijo, da smo jo zaščitili pred vplivom svetlobe.
3. Nato smo mikrotitracijsko ploščo vstavili v analizator Luminex in izmerili jakost fluorescenčne svetlobe.



Slika 21: Analizator Luminex (Austin, Texas, ZDA).

3. 3. 2. 2 Postopek izvedbe testa z diagnostičnim kompletom Plexus

- Vzorce in reagente smo ogreli na sobno temperaturo.
- Reagenčno slepo, pozitivno in negativno kontrolo, tri kalibratorje enakih koncentracij in vzorce smo razredčili z razredčevalnim pufrom v razmerju 1:51 na pripravljenih testno razredčevalnih ploščah ali epruvtkah in dobro premešali.
- 50 µl vsake pripravljene razredčine smo prinesli na filtracijsko ploščo.
- Dodali smo 50 µl pripravljene suspenzije polistirenskih kroglic.
- Ploščo smo pokrili z alu folijo, da smo jo zaščitili pred vplivom svetlobe in stresali na stresalniku 30 minut pri sobni temperaturi.
- Po stresanju smo tekočino v vdolbinicah posesali z vakuumsko črpalko.
- Naslednja stopnja je bila spiranje, kjer smo v vsako vdolbinico dodali 200µl 1x izpiralnega pufru in nato tekočino posesali z vakuumsko črpalko. Spiranje smo ponovili dvakrat.
- Nato smo v vsako vdolbinico dodali 100µl konjugata, pokrili in stresali 30 minut pri sobni temperaturi.
- Ponovno smo spirali 2x z 200µl 1x izpiralnega pufru in odstranili odvečno tekočino z vakuumom.
- Ker je meritev potekala v 1x izpiralnem pufru, smo dodali še 100 µl slednjega, stresali 5 minut in izmerili na analizatorju Luminex.

3. 3. 2. 3 Postopek izvedbe testa z diagnostičnim kompletom AtheNA

- Vzorce, reagente, pozitivno in negativno kontrolo smo ogreli na sobno temperaturo. Razredčili smo jih z razredčevalnim sredstvom v razmerju 1:21 na pripravljenih testno razredčevalnih ploščah in dobro premešali.
- Na filtrirno ploščo smo odpipetirali 50 µl pripravljene suspenzije polistirenskih kroglic.
- Raztopini kroglic smo dodali 10 µl pripravljenih razredčin, stresali 30 s in nato pokrito ploščo inkubirali 30 minut.
- Tekočino smo po inkubaciji posesali, ter spirali 3x z 200 µl 1x izpiralnega pufra. Po spiranju smo tekočino posesali z vakuumom.
- Ploščo smo sušili na zraku 5 minut, ter nato dodali 150 µl konjugata. Stresali na stresalniku 30 sekund, nato pa ponovno inkubirali 30 minut.
- Pred merjenjem na analizatorju Luminex smo ploščo stresali še 30 sekund.

3. 3. 3 Vrednotenje rezultatov

3. 3. 3. 1 Vrednotenje rezultatov : AtheNA Multi-Lyte

Diagnostični komplet AtheNA Multi-Lyte je kvantitativno ovrednotil specifična protitelesa proti VEB: VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG. Pri tem je proizvajalec Zeus Scientific za uporabo slednjega diagnostičnega kompleta na podlagi analiz in raziskav, določil intervalne vrednosti posameznih protiteles (preglednica III), znotraj katerih se morajo vrednosti nahajati. Vrednosti so ovrednotene s številom arbitrarnih enot na mililiter seruma (AU/ml). Analizator je na podlagi referenčnega intervala podal interpretacijo rezultatov (negativno/mejno/pozitivno).

Pri določanju protiteles razreda IgM pa je lahko, zaradi lažne reakcije podal interpretacijo NSC (ang. non-specific control). Slednjo je podal ob sumu na prisotnost revmatoidnega faktorja-RF (ang. rheumatoid factor), ki je lahko bil prisoten v serumu preiskovanca in je lažno reagiral z VCA IgG. Revmatoidni faktor predstavljajo protitelesa razreda IgM, usmerjena proti virusno specifičnim protitelesom IgG, vezanim z antigenom virusa. Če je revmatoidni faktor prisoten, ga je po priporočilih proizvajalca potrebno odstraniti in test ponoviti. Pri uporabi diagnostičnega kompleta AtheNA smo uporabili negativno in pozitivno kontrolo brez kalibratorjev, saj je sistem zasnovan na notranji (interni) kalibraciji uporabljenega kompleta reagentov. Princip kalibracije imenovane »Intra-well Calibration Technology« temelji na suspenziji polistirenskih kroglic (ang. bead suspension), na podlagi katere je podana večtočkovna umeritvena standardna krivulja. Vrednosti krivulje so specifične, kodirane in različne za vsako kalibracijo, odvisno od samega kompleta reagentov.

Preglednica III: Interpretacija rezultatov diagnostičnega kompleta AtheNA Multi-Lyte v AU/ml (Zeus Scientific).

Vrednost (AU/ml)	Rezultat	Interpretacija
< 100	negativni rezultat	Če so vrednosti v vzorcu manjše od 100 AU/ml pomeni, odsotnost specifičnih protiteles proti VEB, analizator pa jih zazna kot nespecifična protitelesa in poda negativni rezultat.
100 - 120	mejni rezultat	Če se vrednosti nahajajo znotraj mejnega območja, pomeni da je koncentracija specifičnih protiteles proti VEB v vzorcu na meji med prisotnostjo/odsotnostjo protiteles proti VEB, zato proizvajalec priporoča testiranje istega vzorca z metodo IFA ali ELISA.
>120	pozitivni rezultat	Če so vrednosti v vzorcu večje od 120 AU/ml pomeni, prisotnost protiteles proti VEB. Glede na vrsto pozitivnega označevalca se opredeli status okužbe.

3. 3. 3. 2 Vrednotenje rezultatov : Plexus™

Diagnostični komplet Plexus™ je kvantitativno ovrednotil specifična protitelesa proti VEB: VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG., ter nespecifična heterofilna protitelesa.

Test Focus Diagnostics je poleg interpretacije številčne vrednosti pri določanju protiteles razreda IgG podal indeks relativne vrednosti, pri določanju protiteles razreda IgM pa je podal še srednjo fluorescenčno intenziteto (MFI-ang. median fluorescence intensity). Vrednosti znotraj katerih morajo biti kontrole, kalibratorji in vzorci so podane v navodilih proizvajalca. Referenčne vrednosti vzorcev pa prikazuje preglednica IV.

Preglednica IV: Interpretacija rezultatov diagnostičnega kompleta Plexus™ (Focus Diagnostics).

Indeks relativne vrednosti	Rezultat	Interpretacija
< 0.90	negativni rezultat	Če je indeks relativne vrednosti manjši od 0.90 gre za odsotnost specifičnih protiteles proti VEB razreda IgM in IgG, ter nespecifičnih heterofilnih protiteles proti VEB.
0.90 - 1.10	mejni rezultat	Če se vrednosti indeksa relativne vrednosti nahajajo znotraj mejnega območja, pomeni da je koncentracija specifičnih in nespecifičnih protiteles proti VEB v vzorcu na meji med prisotnostjo/odsotnostjo protiteles proti VEB, zato proizvajalec priporoča ponovno testiranje po dveh-treh tednih ali vzorec testirati z IFA.
>1.10	pozitivni rezultat	Če je indeks relativne vrednosti večji od 1.10 gre za prisotnost specifičnih protiteles proti VEB razreda IgG in IgM, ter nespecifičnih heterofilnih protiteles proti VEB.

Uporabili smo pozitivno in negativno kontrolo s pomočjo katerih smo preverili in potrdili natančnost in pravilnost našega dela in metode. Kontrolo postopka pa je poleg kontrol predstavljal tudi kalibrator, ki smo ga ponovili trikrat. Vse tri vrednosti kalibratorjev so morale biti čim bolj enake.

3. 3. 3. 3 Vrednotenje rezultatov: Liaison

Analizator Liaison izmeril svetlobni signal, ki ga odda izoluminolni-protitelesni konjugat v relativnih luminiscenčnih enotah-RLU (ang.: relative luminiscence units) in je sorazmeren s koncentracijo protiteles v vzorcih, kontrolah in kalibratorjih. Rezultate koncentracij poda v enotah/ml (U/ml).

V primerjavi s prejšnjima dvema sistemoma, ki imata samo tri mejne intervale za vse štiri označevalce, ima sistem DiaSorin podane mejne vrednosti za vse štiri parametre ločeno. (preglednica V).

Preglednica V: Interpretacija rezultatov kemiluminiscenčnega testa Liaison (Diasorin).

Vrsta protitelesa	Negativni rezultata (U/ml)	Mejni rezultat (U/ml)	Pozitivni rezultat (U/ml)
VCA IgM	< 20	20 - 40	≥ 40
VCA IgG	< 20	20	≥ 20
EBNA IgG	< 5	5 - 20	≥ 20
EA IgG	< 40	40	≥ 40

3. 3. 3. 4 Vrednotenje rezultatov: status okužbe

Pri vseh treh metodah smo interpretacije rezultatov (pozitivno/mejno/negativno), ki sta nam jih podala analizatorja opredelili z različnimi stopnjami okužbe z VEB: akutno (A), preteklo okužbo (P), ter odsotnost okužbe (N) (preglednica VI). Ko interpretacija rezultatov ni ustrezala nobeni od slednjih smo jo opredelili, kot neopredeljiv status okužbe (I- ang.: indeterminate). Vrednosti pri katerih se je pojavila oznaka NSC, smo prišteli k neopredeljivim rezultatom.

Preglednica VI: Serološki status okužbe z VEB

+ (pozitivni rezultat), - (negativni rezultata), -/+ (negativni ali pozitivni rezultat)

NSC (ang. non specific control-nespecifična kontrola)

Stopnja okužbe	Vrsta protiteles				
	VCA IgM	Heterofilna protitelesa	VCA IgG	EBNA IgG	EA IgG
Akutna okužba	+	-/+	+	-	-
Pretekla okužba	-	-	+	+	+/-
Ni okužbe	-	-	-	-	-
Neopredeljiv status okužbe	-	-	+	-	-
	-	-	-	+	-
	+	+	+	+	+
	NSC	NSC	-/+	-/+	-/+

S serološkimi preiskavami, lahko določimo specifična protitelesa proti VEB in določimo status okužbe. Za vsako obdobje je značilna prisotnost določenih protiteles. V serumu se po virusni okužbi pojavijo najprej protitelesa VCA IgM in nato IgG. Ker so VCA IgG v serumu prisotna dolgo časa po okužbi, dokazuje pozitiven rezultat prebolele okužbe z VEB. Protitelesa VCA IgG in VCA IgM so klinično zelo pomembna, saj ločimo akutno okužbo od pretekle. Pri nedavni okužbi bolezenski znaki izginejo, z dokazom protiteles pa lahko ugotovimo, da od začetka okužbe ni minilo več kot 3 do 6 tednov. Za preteklo okužbo so značilna protitelesa EBNA IgG in visoka koncentracija protiteles VCA IgG, včasih tudi EA IgG.

3. 3. 3. 5 Izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti testov

Vse tri teste smo ovrednotili na podlagi ujemanja (U), diagnostične občutljivosti (O) in diagnostične specifičnosti (S), izraženih v odstotkih (%). Specifičnost in občutljivost redko podajamo redko z relativno vrednostjo.

Diagnostično občutljivost (ang. sensitivity) predstavlja delež bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Izražamo jo v odstotkih, predstavlja pa verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, pri katerih je bolezen prisotna. Večja kot je diagnostična občutljivost testa, manjše je število lažno negativnih rezultatov.

Metoda je občutljiva, kadar lahko z njo dobimo pozitiven rezultat in vzorec resnično vsebuje merjeno sestavino. Če v vzorcu, ki vsebuje določeno sestavino, z neko metodo ne izmerimo njene navzočnosti, pričakujemo pa, da jo vsebuje, pravimo, da smo dobili lažno negativen rezultat. Vzroka za lažno negativen rezultat sta dva: mogoče metoda res ne zazna sestavine, ki je v vzorcu in je rezultat tudi analitsko napačen. Pogosto pa je lažno negativen rezultat vezan na biološko raznolikost in ne na samo metodo: bolnik dejansko nima patološkega parametra, ki ga pričakujemo in je rezultat z analitskega vidika pravilen (27,28).

Diagnostična specifičnost (ang. specificity) je definirana kot delež oseb, ki nimajo preiskovane bolezni, in pri katerih je rezultat testa negativen. Predstavlja delež resnično negativnih dogodkov, ki smo jih pravilno ugotovili. Pri določanju specifičnosti predvidevamo, da v vzorcu ni iskane sestavine. Če s testom dobimo pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja kot je diagnostična specifičnost testa, manjše je število lažno pozitivnih rezultatov (27,28).

Kot resnično pozitivne ali negativne smo ovrednotili tiste rezultate, ki so bili skladni s primerjajočima se testoma. Lažno pozitivni ali negativni pa so bili tisti rezultati, ki so bili neskladni v primerjavi s sistemom Liaison. V primerjavi dveh diagnostičnih kompletov, Plexus in AheNA, pa smo lažno pozitivne ali negativne vrednotili glede na test AtheNA. Občutljivost in specifičnost prikazujeta spodnji enačbi:

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{resnično negativni} * 100}{\text{resnično negativni} + \text{lažno pozitivni}}$$

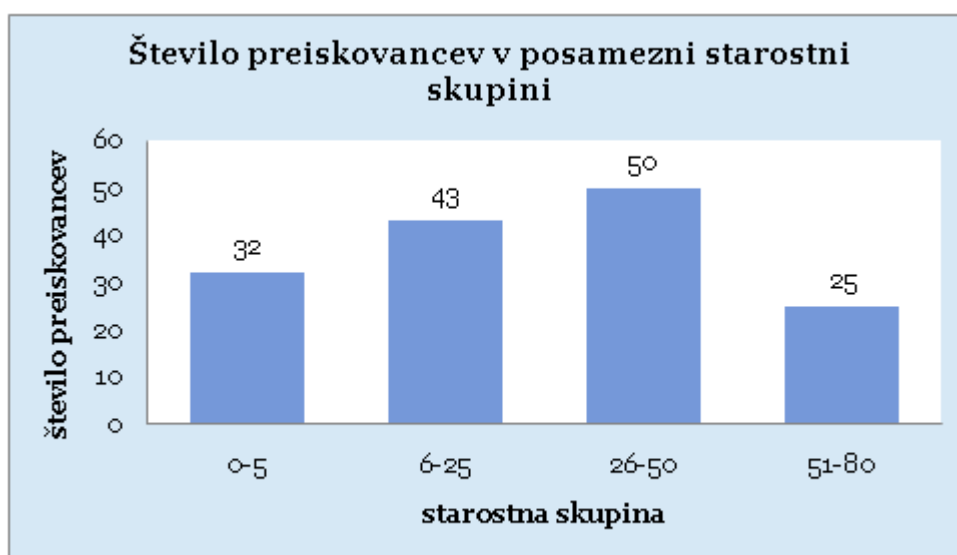
$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{resnično pozitivni} * 100}{\text{resnično pozitivni} + \text{lažno negativni}}$$

Enačba 1: Formuli za izračun občutljivosti in specifičnosti.

4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo primerjali tri diagnostične komplete reagentov, ki smo jih analizirali na dveh različnih analizatorjih. Metodo proizvajalca Diasorin smo primerjali z dvema multipleks metodama različnih proizvajalcev Focus Diagnostics in Zeus Scientific.

V raziskavo smo vključili 150 vzorcev preiskovancev s sumom na okužbo z VEB. Med vzorci je bilo 83 preiskovancev ženskega spola (55,3%) in 67 preiskovancev moškega spola (44,7%). 75 preiskovancev (50,0%) je pripadalo starostni skupini od 0. mesecev do 25 leta, 75 preiskovancev (50,0%) pa je bilo starih od 26 let ali več. Osem preiskovancev je bilo starih manj kot eno leto, najstarejši preiskovanec pa je bil star 80 let. Največ je bilo preiskovancev starih od 26 do 50 leta. Število preiskovancev, posameznih starostnih skupin prikazuje slika 19.



Slika 22: Grafična predstavitev števila preiskovancev po posameznih starostnih skupinah.

V raziskavi smo z vsemi uporabljenimi testi določali specifična protitelesa proti VEB: VCA IgG, VCA IgM, EBNA IgG in EA IgG. Pri proizvajalcu Focus Diagnostics pa smo hkrati s specifičnimi protitelesi, določali tudi prisotnost heterofilnih protiteles razreda IgM.

4. 1 Primerjava rezultatov med testoma Liaison in Plexus

Rezultate kemiluminiscenčne metode-sistema Liaison in multipleks metode-sistema Luminex, diagnostični komplet Plexus prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti VEB s testoma Liaison in Plexus.

Legenda: VCA (virusni kapsidni antigen), EBNA (Epstein Barr jedrni antigen), EA(zgodnji antigen), U(ujemanje), O (občutljivost), S (specifičnost)
+ (pozitivni rezultat), - (negativni rezultat), +/- (mejni rezultat)

	Liaison					
Plexus	+	-	+/-	U (%)	O (%)	S (%)
VCA IgM				88,7	77,3	95,0
+	17	6	0			
-	5	115	6			
+/-	0	0	1			
VCA IgG				87,3	92,9	60,9
+	117	9	0			
-	9	14	0			
+/-	1	0	0			
EBNA IgG				92,7	100,0	87,8
+	101	5	2			
-	0	36	4			
+/-	0	0	2			
EA IgG				76,7	66,7	81,1
+	16	23	0			
-	8	99	0			
+/-	1	3	0			

Pri dokazovanju specifičnih protiteles VCA IgM s testoma Liaison in Plexus smo dokazali skladne rezultate pri 17 pozitivnih vzorcih (11,3%), 115 negativnih (76,7%) in enemu mejnemu rezultatu (0,7%). Rezultati so bili skladni pri 133 preiskovanih vzorcih (88,7%) in neskladni pri 17 (11,3%) vzorcih. Pri 6 vzorcih smo s testom Plexus ugotovili negativni rezultat, s testom Liaison pa mejni rezultat. Pri petih vzorcih smo s testom Plexus ugotovili negativni rezultat, test Liaison pa jih je ovrednotil kot pozitivne. Šest pozitivnih s testom Plexus, je test Liaison ovrednotil kot negativne. Občutljivost je bila 77,3%, specifičnost 95%.

Pri določanju VCA IgG smo dokazali skladne rezultate na obeh testih pri 117 pozitivnih (78,0%) in 14 negativnih (9,3%) vzorcih, skupaj 131 vzorcih (87,3%). Devet rezultatov je test Liaison ovrednotil kot negativne, medtem ko jih je Plexus ovrednotil za pozitivne in obratno. Test Plexus je ovrednotil še en mejni rezultat, ki ga je Liaison ovrednotil za pozitivnega. Občutljivost je bila 92,9%, specifičnost pa je znašala 60,9 %.

Določanje protitelesa EBNA IgG je podalo skupaj 139 skladnih rezultatov (92,7%); od tega 101 pozitivnih (67,3%), 36 negativnih (24,0%) in 2 mejna (1,3%) rezultata. Pri 11 vzorcih (7,3%) je prišlo do neskladnosti rezultatov. Test Liaison je pri 5 vzorcih podal negativni rezultat, test Plexus pa ga je ovrednotil za pozitivnega. Pri štirih vzorcih je Liaison podal mejni, Plexus pa negativni rezultat. Dva vzorca sta bila s testom Plexus pozitivna, s testom Liaison pa negativna. Pri obeh diagnostičnih sistemih nismo dobili lažno negativnih rezultatov, zato je bila občutljivost pri obeh sistemih enaka 100,0 %. Specifičnost pa je bila 87,8%.

Največ neujemanja smo zasledili pri določanju protiteles EA IgG, ki je kot pokazatelj okužbe z VEB najmanj pomemben, saj ne vpliva na končno opredelitev statusa okužbe. Določili smo 115 skladnih rezultatov (76,7%) od tega 16 (10,7%) pozitivnih in 99 (66,0%) negativnih rezultatov. Pri 23 vzorcih smo s testom Liaison ugotovili negativni rezultat, s testom Plexus pa pozitivnega. Pri treh vzorcih, ki jih je Liaison ovrednotil za negativne, jih je Plexus ovrednotil za mejne. Osem pozitivnih rezultatov pri testu Liaison, je bilo negativnih pri testu Plexus in en mejni rezultat pri testu Plexus je bil pozitiven s testom Liaison. Skupaj je bilo neskladnih rezultatov 35 (23,3%). Občutljivost je znašala 66,7%, specifičnost pa 81,1%.

4. 2 Primerjava rezultatov med testoma Liaison in AtheNA

Rezultate kemiluminiscenčne metode, testa Liaison in multipleks metode-sistema Luminex, diagnostični komplet AtheNA prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Primerjava (ujemanje, občutljivost, specifičnost) rezultatov pri dokazovanju specifičnih protiteles proti VEB s testoma Liaison in AtheNA.

Legenda: VCA (virusni kapsidni antigen), EBNA (Epstein Barr jedrni antigen), EA(zgodnji antigen),

U(ujemanje), O (občutljivost), S (specifičnost)

+ (pozitivni rezultat), - (negativni rezultat), +/- (mejni rezultat)

	Liaison					
AtheNA	+	-	+/-	U (%)	O (%)	S (%)
VCA IgM				86,7	81,0	98,2
+	17	2	0			
-	4	112	6			
+/-	0	1	1			
VCA IgG				89,3	99,2	36,4
+	126	14	0			
-	1	8	0			
+/-	0	1	0			
EBNA IgG				86,0	100,0	68,3
+	101	13	7			
-	0	28	1			
+/-	0	0	0			
EA IgG				60,0	52,2	66,7
+	12	39	0			
-	11	78	0			
+/-	2	8	0			

Pri dokazovanju protiteles VCA IgM smo dokazali skladne rezultate pri obeh testih, pri 17 pozitivnih vzorcih (11,3%), 112 negativnih (74,7%) in enemu mejnemu rezultatu (0,7%). Rezultati so se skupno ujemali pri 130 preiskovanih vzorcih (86,7%), neskladni pa so bili pri 13 vzorcih (8,7%). Pri šestih vzorcih smo s testom Liaison ugotovili mejni rezultat, s testom AtheNA pa negativni rezultat. Pri dveh vzorcih smo s testom Liaison ugotovili negativni rezultat, test AtheNA pa jih je ovrednotil kot pozitivne. Negativni rezultat pri testu Liaison, je pripadal mejni vrednosti pri testu AtheNA.

Ugotovili smo štiri negativne rezultate s testom AtheNA, ki jih je test Liaison ovrednotil kot pozitivne. Občutljivost je bila 81,0% specifičnost pa je znašala 98,2%.

Pri določanju VCA IgG smo dokazali skladne rezultate na obeh sistemih pri 126 pozitivnih (84,0%) in 8 negativnih (5,3%) vzorcih, skupaj pri 134 vzorcih (89,3%). 14 rezultatov je test Liaison ovrednotil kot negativne, medtem ko jih je test AtheNA ovrednotil za pozitivne. Liaison je ovrednotil en negativni rezultat, ki ga je test AtheNA ovrednotil za mejnega, ter en pozitiven rezultat pri testu Liaison, ki je pripadal negativni vrednosti pri testu AtheNA. Občutljivost je bila 99,9%, specifičnost 36,4 %.

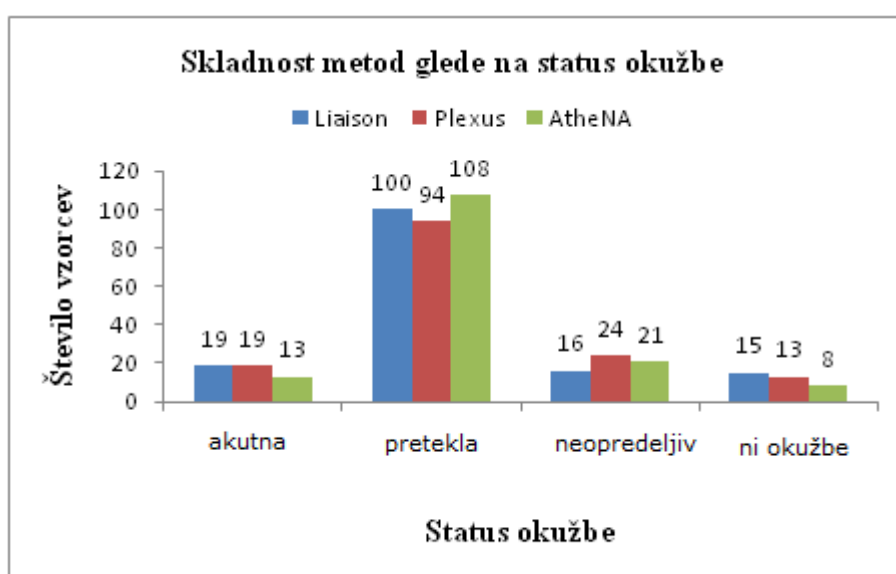
Določanje protiteles EBNA IgG je podalo skupaj 28 negativnih skladnih rezultatov (18,7%) in 101 (67,3%) pozitivnih skladnih rezultatov. 21 (14,0%) rezultatov je bilo neskladnih. Test Liaison je pri 13 vzorcih podal negativni rezultat, Athena pa jih je ovrednotil za pozitivne. Pri sedmih vzorcih je Liaison podal mejni, diagnostični komplet AtheNA pa pozitiven rezultat. En vzorec je bil s testom AtheNA negativen, s testom Liaison pa mejni. Pri obeh diagnostičnih sistemih nismo dobili lažno negativnih rezultatov zato je bila občutljivost pri obeh sistemih enaka 100,0%. Specifičnost pa je bila pri 28 resnično negativnih in 13 lažno pozitivnih rezultatih 68,3%.

Največ neujemanja smo ponovno zasledili pri določanju protiteles EA IgG, kjer smo določili 90 skladnih rezultatov (60,0%); 12 (8,0%) pozitivnih in 78 (52,0%) negativnih rezultatov. Pri 39 vzorcih smo s testom Liaison ugotovili negativni rezultat, s testom AtheNA pa pozitivnega. Pri 8 vzorcih, ki jih je Liaison ovrednotil za negativne, jih je AtheNA ovrednotil za mejne. Enajst pozitivnih rezultatov pri testu Liaison, je bilo negativnih pri testu AtheNA. Dva mejna rezultata pri testu AtheNA, sta bila pozitiven s testom Liaison. Skupaj je bilo 60 (40,0%) neskladnih rezultatov. Občutljivost je znašala 52,2% , specifičnost pa 66,7%.

4. 3 Rezultati skladnosti treh metod

Rezultati, ki smo jih pridobili s tremi metodami so številčni podatki določenega označevalca, vrednost katerega analizator umesti v predpisano referenčno območje. Samo ovrednotenje posameznega rezultata, ki ga poda analizator (pozitivno/mejno/negativno/NSC) je sicer zelo pomembno, vendar to za laboratorijsko interpretacijo statusa okužbe z VEB nima kliničnega pomena.

Zato smo na podlagi rezultatov imunski odziv na okužbo z VEB interpretirali na podlagi preglednice VI in opredelili stopnjo okužbe (akutno, preteklo okužbo, ni okužbe in neopredeljiv rezultat).



Slika 23: Ujemanje števila preiskovanih vzorcev s tremi metodami glede na status okužbe.

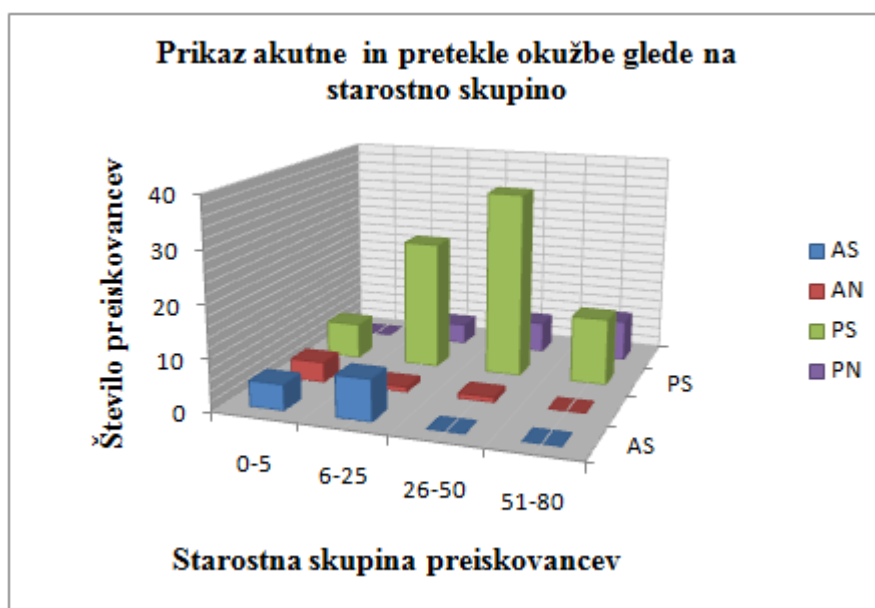
S primerjavo rezultatov (slika 23) treh metod smo ugotovili skladnost rezultatov glede na status okužbe. Akutno okužbo smo ugotovili pri 19 preiskovancih s testoma Liaison in Plexus. S testom AtheNA, pa smo akutno okužbo ugotovili pri 13 preiskovancih.

Preteklo okužbo smo s testom Liaison ugotovili pri 100 preiskovancih, s testom Plexus pa smo jih ugotovili 6 manj. S testom AtheNA smo ugotovili 108 preiskovancev, ki so že preboleli okužbo z VEB. Šestnajstim preiskovancem s testom Liaison, 24 preiskovancem s testom Plexus in 21 preiskovancem s testom AtheNA nismo mogli določiti statusa okužbe, zato smo jih ovrednotili kot neopredeljiv status okužbe.

Petnajst preiskovancev ugotovljenih s testom Liaison in 13 preiskovancev s testom Plexus še nikoli ni prišlo v stik z VEB, saj pri njih nismo ugotovili prisotnosti specifičnih protiteles. Tudi pri osmih preiskovancih testom AtheNA nismo ugotovili protiteles proti VEB. Zanimiv je tudi podatek starosti dveh preiskovancev, moškega starega 43 let in ženske stare 30 let, pri katerih smo s tremi metodami ugotovili odsotnost okužbe z VEB.

Pri diagnostičnemu kompletu Plexus, proizvajalca Focus Diagnostics smo si pri interpretaciji statusa okužbe z VEB pomagali še s pomočjo nespecifičnih heterofilnih protiteles. Nespecifična protitelesa smo ugotovili pri 10 preiskovancih (6,7%), katerih povprečna starost je znašala 11,4 let. Najmlajši preiskovanec je bil star 4 leta, najstarejši pa 18 let. Pri vseh desetih preiskovancih smo z vsemi tremi metodami določili akutno okužbo.

Slika 24 spodaj, prikazuje primerjavo rezultatov treh metod, kjer smo opredelili skladnost in neskladnost rezultatov pri akutni in pretekli okužbi, glede na starostno skupino. Pri tem smo skladnost akutne (AS) in pretekle okužbe (PS) definirali, če so vse tri metode podale enak rezultat statusa okužbe. Če je ena od metod odstopala od testa Liaison, smo jo opredelili kot neskladno akutno (AN), oziroma neskladno preteklo okužbo (PN).



Slika 24: Prikaz akutne in pretekle (skladne ali neskladne) okužbe glede na starostno skupino.

Ugotovili smo, da največji odstotek prekuženosti z VEB predstavlja starostna skupina od 26 do 50 let (84%), kateri sledi starostna skupina od 6 do 25 let (67,4%). Od tega je bilo v starostni skupini od 26 do 50 let 72,0 % preiskovancev, pri katerih smo z vsemi tremi metodami potrdili preteklo okužbo in zabeležili skladnost preiskovanih metod, ter 12,0% preiskovancev, kjer rezultati metod niso bili skladni.

Pri starostni populaciji od 26-50 let in populaciji od 51-80 let nismo ugotovili akutne okužbe. Akutno okužbo smo ugotovili pri starostni skupini od 6 do 25 let, kjer smo od 43 preiskovancev ugotovili akutno okužbo s tremi metodami pri 8 (18,6%) preiskovancih. Pri enem preiskovancu (2,3%) so bili rezultati akutne okužbe neskladni v primerjavi s testom Liaison. Akutno okužbo z vsemi tremi metodami smo ugotovili še v starostni skupini od 0 do 5 let, kjer smo zabeležili 5 (15,6%) skladnih rezultatov in 4 (12,5%) neskladne rezultate. 8 (25,0%) preiskovancev starih od 0 do 5 let je že prišlo v stik z VEB, saj smo pri njih ugotovili preteklo okužbo z vsemi tremi metodami.

Serološki status posameznikov smo definirali s pomočjo posameznih označevalcev (preglednica VI) in ugotovili skladnost treh metod (preglednica X).

Preglednica IX: Skladnost rezultatov serološkega statusa testov AtheNA in Plexus v primerjavi s testom Liaison (* precejšnje odstopanje 4,7 % (n=7) ;** zanemarljivo odstopanje 17,3 % (n=26)).

Kemiluminiscenčna metoda, test: Liaison	Multipleks metoda, testa: AtheNA, Plexus				
	Akutna okužba	Pretekla okužba	Ni okužbe	Neopredeljiv status okužbe	Skupno vsota
Akutna okužba	13	0	0	5**	18
Pretekla okužba	0	93	0	8**	101
Ni okužbe	0	2*	8	5*	15
Neopredeljiv status okužbe	0	13**	0	3	16
Skupno vsota	13	108	8	21	150

Od 150 preiskovanih vzorcev je bilo 33 (22,0%) neskladnih, od tega je bilo 7 (4,7%) precejšnje odstopajočih vzorcev (ang. major discrepancy) in 26 (17,3%) zanemarljivo odstopajočih vzorcev (ang. minor discrepancy). Ugotovili smo 13 (8,7%) skladnih vzorcev pri akutni in 93 (62,0%) pri pretekli okužbi. Pri osmih vzorcih (5,3%) smo s tremi metodami ugotovili odsotnost okužbe, saj nismo dokazali prisotnosti protiteles proti VEB. Trem vzorcem (2,0%) s tremi metodami nismo mogli opredeliti statusa okužbe.

Diagnostični komplet AtheNA je pri določanju specifičnih protiteles VCA IgM zasnovan tako, da v primeru prisotnosti revmatoidnega faktorja ovrednoti rezultat kot NSC (ang. non-specific control). Slednje smo ugotovili pri 7 preiskovancih od 150 testiranih. Ker nam je test AtheNA podal rezultat NSC, vzorcem nismo mogli določiti statusa okužbe, zato smo jih definirali kot neopredeljiv status okužbe. Primerjavo rezultatov protiteles VCA IgM, ki smo jih ugotovili s tremi metodami prikazujemo v preglednici XI.

Preglednica X: Prikaz rezultatov dveh testov (Liaison, Plexus) in testa AtheNA z interpretacijo NSC pri sedmih preiskovancih

Številka vzorca	Starost preiskovanca (let)	Liaison VCA IgM	Plexus VCA IgM	AtheNA VCA IgM	AtheNA VCA IgG
4106	38	NEG	POZ	NSC	POZ
4167	23	NEG	POZ	NSC	POZ
4171	65	NEG	POZ	NSC	POZ
4232	43	NEG	NEG	NSC	POZ
4305	67	NEG	POZ	NSC	POZ
4345	24	POZ	POZ	NSC	POZ
4410	47	NEG	NEG	NSC	POZ

S testom Liaison smo ugotovili en pozitivno interpretiran rezultat, od skupaj 7 preiskovancev z oznako NSC pri testu AtheNA. To pomeni, da smo s testom Liaison ugotovili samo en lažno pozitivni rezultat pri preiskovanki stari 24 let. S testom Plexus smo pri istih sedmih preiskovancih ugotovili 5 vzorcev s prisotnostjo protiteles VCA IgM. Pri dveh vzorcih, ki so bili negativni s testom Liaison je test Plexus podal negativni rezultat. V preglednici XI smo v zadnjem stolpcu podali rezultat protitelesa VCA IgG, kar nakazuje na preteklo okužbo preiskovancev s testom AtheNA.

5 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo primerjali tri serološke teste. Kemiluminiscenčno metodo, sistem Liaison, ki se uporablja v rutinski diagnostiki in dve moderni multipleks metodi, sistem Luminex, dveh različnih diagnostičnih kompletov Plexus (Focus Diagnostics) in AtheNA (Zeus Scientific). Poskušali smo ugotoviti, katera metoda je bolj občutljiva in specifična, oziroma preveriti specifičnost rutinske metode. Vključili smo 150 vzorcev (serumov) preiskovancev s sumom na okužbo z VEB. Med vzorci seruma je bilo 83 preiskovancev ženskega spola (55,3%) in 67 preiskovancev moškega spola (44,7%).

Rezultate smo primerjali z raziskavo, ki so jo leta 2008 izvedli v Ameriki, izsledke slednje pa podali v članku z naslovom *Evaluation of a Multiplex Fluorescent Microsphere Immunoassay for Determination of Epstein-Barr Virus Serologic Status*. V raziskavi so primerjali encimsko imunski test (ELISA) in indirektno fluorescenco (IFA) z multipleks metodo, kjer so uporabili sistem Luminex, ter diagnostični komplet AtheNA Multi- Lyte proizvajalca Zeus Scientific. Slednjega smo v naši diplomski nalogi uporabili tudi mi.

V omenjeni raziskavi so testirali 158 vzorcev seruma, kjer so določali specifična protitelesa proti VEB, ter določili status okužbe. Njihova opredelitev statusa okužbe je bila bolj podrobna, saj so poleg akutne in pretekle okužbe, neopredeljivega statusa okužbe, ter odsotnosti okužbe vključili še sumljive okužbe, zgodnjo okužbo, ter nedavno okužbo. Multipleks metodo so izvedli po enakemu postopku kot mi, z enakimi pogoji in redčinami.

Potrdili so, da je zlati standard v diagnostiki okužb z VEB še vedno metoda indirektna fluorescenco, čeprav so jo začele izpodrivati modernejšie, preprostejšie in bolj kvalitetne metode. Ena izmed njih je zagotovo multipleks metoda, ki so jo evaluirali in ugotovili najboljše ujemanje prav z zlatim standardom. Ujemanje je bilo pri določanju vseh štirih specifičnih protiteles nad 90,0%.

V raziskavi so ugotovili, da je ujemanje specifičnih protiteles VCA IgM multipleks metode in testa ELISA sprejemljivo (86,6%), ujemanje s testom IFA pa je bilo 92,9%. Najboljše ujemanje (93,5%) so zabeležili med testoma ELISA in IFA. Občutljivost testa ELISA v primerjavi z multipleks metodo sistema Luminex je bila 56,3%. Specifičnost testa IFA v primerjavi z multipleks metodo pa je bila 71,9%, ter specifičnost 98,4%. Najboljše ujemanje specifičnosti (96,7%) in občutljivosti (81,3%) pri VCA IgM so ugotovili pri testih ELISA in IFA.

Pri določanju VCA IgM smo v naši raziskavi ugotovili, da je bilo ujemanje med testoma Liaison in Plexus 88,7%, občutljivost 77,3%, ter specifičnost 95,0%. Ujemanje med testoma Liaison in AtheNA je bilo nižje 86,7%, občutljivost pa je bila za 3,7% višja, glede na predhodno primerjavo. Specifičnost je znašala 98,2%.

Pri merjenju protiteles VCA IgG so ugotovili zelo dobre rezultate multipleks metode s testom ELISA, saj je bilo ujemanje 92,8% in občutljivost 99,2%, zabeležili pa so nizko specifičnost, ki je znašala 54,5%. Specifičnost je bila nizka zaradi 10 pozitivnih rezultatov z multiplex metodo, ki so bili negativni s testom ELISA. Specifičnost med multipleks in testom IFA je bila 85,7%, med testoma ELISA in IFA pa 100,0%. Ugotovili so, da je multipleks metoda podala dobro občutljivost (99,3%) s testom ELISA in slabšo (94,9%) s testom IFA.

Ko smo primerjali rezultate rutinske metode pri določanju VCA IgG s testom AtheNA, smo zabeležili 89,3% ujemanje. Ujemanje s testom Plexus je znašalo 87,3%. Tudi občutljivost je bila boljša s testom AtheNA (99,2%), s testom Plexus pa nekoliko nižja (92,9%). Specifičnost je pri 9 lažno pozitivnih rezultatih s testom Plexus primerjavi s testom Liaison znašala 60,9%. Pri 14 lažno pozitivnih rezultatih, ki smo jih zabeležili s testom AtheNA, je specifičnost v primerjavi s testom Liaison znašala 36,4%.

V ameriški raziskavi je bilo ujemanje med multipleks in ELISA testom pri določanju EBNA IgG 90,3%, specifičnost 73,2% in občutljivost 100,0%. Ko so primerjali multipleks metodo z IFA so ugotovili še boljše občutljivost 100,0% , visoko specifičnost 93,2% in zelo dobro ujemanje 98,1%, ki je bilo boljše v primerjavi med testoma ELISA in IFA (92,3%). Med slednjima je bila specifičnost 100,0% in občutljivost 89,2%.

S testoma Plexus in Liaison, pri določanju EBNA IgG v naši raziskavi nismo ugotovili lažno negativnih rezultatov, zato je bila občutljivost pri obeh testih enaka 100,0%. Specifičnost pa je bila pri 36 resnično negativnih in 5 lažno pozitivnih rezultatih z obema testoma 87,8%. Ujemanje med njima je bilo 92,7%, kar je za 6,7% več v primerjavi med testom Liaison in testom AtheNA. Pri vseh treh metodah smo ugotovili dobro občutljivost (100,0%) medtem, ko je specifičnost med testoma Plexus in Liaison znašala 87,8%. Med testoma Liaison in AtheNA je pri določanju EBNA IgG bila specifičnost relativno nizka (68,3%).

Ujemanje med multipleks in ELISA pri določanju EA IgG je v ameriški študiji znašala 83,8%. Pri tem je bilo 17 vzorcev pozitivnih s testom ELISA, ki so bili negativni z multipleks metodo, zato je bila posledično občutljivost 73,0%. Ujemanje med multipleks in IFA (89,9%) je bilo sorazmeroma nizko, ker so ugotovili boljše ujemanje med multipleks metodo in testom IFA (92,8%). Najboljšo specifičnost (96,3%) pri določanju protitelesa EA IgG so ugotovili s testom IFA in multipleks metodo.

V naši raziskavi smo zabeležili med nizko ujemanje med testoma Liaison in Plexus (76,7%), med testoma Liaison in AtheNA pa še nekoliko nižje (60,0%).

Tudi v ameriški študiji so serološki status posameznega preiskovanca določili s pomočjo določanja specifičnih protiteles, ki so pomembna za ocenitev suma na okužbo z VEB. Ugotovili so, da je bilo ujemanje med tremi metodami; testoma ELISA in IFA, ter multipleks metodo 89,9%, od tega so ugotovili 16 odstopajočih rezultatov.

Od 16 je bilo 6 (3,8%) zanemarljivo odstopajočih, medtem ko je bilo 10 (5,3%) precejšnje odstopajočih. Ujemanje serološkega statusa med dvema metodama, kjer so ugotovili najboljše rezultate (ELISA in multipleks metode) je bilo 76,6%. S tremi metodami smo med 150 preiskovanimi vzorci ugotovili 33 (22,0%) neskladnih rezultatov. Od tega je bilo 7 (4,7%) precejšnje odstopajočih vzorcev in 26 (17,3%) zanemarljivo odstopajočih vzorcev. S tremi metodami smo ugotovili 13 (8,7%) skladnih vzorcev pri akutni 93 (62,0%) in 8 (5,3%) pri pretekli okužbi. Pri osmih vzorcih (5,3%) s tremi metodami protiteles nismo določili pri 3 (2,0%) preiskovancih pa smo ugotovili neopredeljiv status okužbe. Skupaj smo ugotovili 117 (78,0%) skladnih rezultatov.

Precejšnje odstopajoči vzorci so bili tisti, kjer smo ugotovili popolno neskladje rezultatov. Kjer smo z enim testom ugotovili odsotnost okužbe, s preostalima dvema pa preteklo okužbo ali neopredeljiv status okužbe in obratno. Pri vzorcu, ki smo ga opredelili kot precejšnje odstopajoč vzorec pri preiskovanki stari 23 let, s testom Liaison nismo ugotovili prisotnost protiteles proti VEB. S testom Plexus smo ugotovili neopredeljiv status okužbe z visoko koncentracijo VCA IgG, medtem ko smo s testom AtheNA ugotovili visoko koncentracijo protiteles VCA IgG in EBNA IgG. Drug nejasen primer smo ugotovili pri preiskovancu staremu manj kot eno leto, kjer smo s testoma Liaison in Plexus ugotovili odsotnost okužbe, s testom AtheNA pa smo ponovno ugotovili visoko koncentracijo protiteles VCA IgG in EBNA IgG.

Pri dveh vzorcih s testom AtheNA nismo mogli podati statusa okužbe, zaradi prisotnosti NSC. Pri enem vzorcu, kjer smo s testom Liaison ugotovili odsotnost okužbe z ostalima dvema multipleks metodama pa neopredeljiv status okužbe, smo pri obeh ugotovili visoko koncentracijo VCA IgG, pri testu Plexus pa še EBNA IgG. Tudi pri dveh vzorcih, kjer smo dobili nasproten rezultat, kot s testoma Liaison in Plexus, smo ugotovili visoko koncentracijo VCA IgG. Vseh sedem vzorcev smo testirali dvakrat z vsemi tremi metodami in ugotovili enake rezultate.

Pri testu AtheNA, proizvajalca Zeus Scientific smo pri določanju VCA IgM ugotovili NSC pri 7 preiskovancih od 150 testiranih. Pri istih preiskovancih smo s testom Plexus ugotovili prisotnost VCA IgM pri petih preiskovancih, pri dveh pa prisotnost VCA IgM nismo ugotovili. Predvidevamo, da je v slednjih petih vzorcih preiskovancev bil prisoten revmatoidni faktor, posledično pa je bila napačna tudi interpretacija statusa okužbe z VEB, saj je prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM značilna za akutno okužbo. Pri dveh vzorcih, ki so bili negativni tudi s testom Liaison je test Plexus podal negativni rezultat, zato jih ne moremo ovrednotiti kot lažno pozitivne. S testom Liaison smo ugotovili en lažno pozitiven rezultat, v serumu 24 letne preiskovanke. Američani pa so od 158 vzorcev določili 23 vzorcev, ki so vsebovali revmatoidni faktor, katerega koncentracijo so tudi določili. Pri 9 (39,0%) vzorcih so NSC določili s sistemom Zeus, vendar le 3 (13,0%) s testom ELISA.

6 SKLEPI

- Večina okužb z VEB temelji na prepoznavnih kliničnih znakih, kljub temu pa je potrebna tudi laboratorijska diagnostika.
- Pri sumu na okužbo z VEB določamo specifična protitelesa proti VEB: VCA IgM, VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG.
- Pri diagnosticiranju okužbe z VEB je pomembno ovrednotenje statusa okužbe (akutna, pretekla okužbe, odsotnost okužbe).
- Kemiluminiscenčna metoda, ki se uporablja v rutini je popolnoma avtomatizirana, medtem ko sta se multipleks metodi izvedli ročno. Avtomatizirano je bilo samo merjenje fluorescence.
- Pri določanju protiteles razreda IgG: VCA IgG, EBNA IgG in EA IgG in IgM: VCA IgG smo pri multipleks metodah uporabili dva diagnostična kompleta, za vsak razred protiteles posebej.
- Pri določanju protiteles s testom Liaison, smo uporabili štiri diagnostične komplete, ločeno za vsako protitelo posebej.
- Najboljše ujemanje z metodo CLIA smo ugotovili z diagnostičnim kompletom Plexus, proizvajalca Focus Diagnostics.
- Ujemanje med testoma Liaison in Plexus je bilo: akutna okužba (100,0%), pretekla okužba (94,0%) in odsotnost okužbe (86,7%).
- Ujemanje med testoma Liaison in AtheNA je bilo: akutna okužbe (68,4%), pretekla okužba (92,6%) in odsotnost okužbe (53,3%).
- Med 150 preiskovanci smo s tremi metodami ugotovili 33 (22,0%) neskladnih vzorcev, od tega je bilo 7 (4,7%) precejšnje odstopajočih vzorcev in 26 (17,3%) zanemarljivo odstopajočih vzorcev.
- S tremi metodami smo ugotovili 13 (8,7%) skladnih rezultatov pri akutni okužbi in 93 (62,0%) pri pretekli okužbi.

- Pri osmih vzorcih (5,3%) s tremi metodami nismo ugotovili prisotnosti protiteles proti VEB, pri treh (2,0%) pa smo ugotovili neopredeljiv status okužbe.
- Pri neskladnih rezultatih bi bilo potrebno preveriti rezultate še z eno metodo, npr. imunoblot.
- Menimo, da bi multipleks metodo proizvajalca Focus Diagnostics lahko uvedli v redno rutinsko diagnostiko z nadaljnjo optimizacijo metode.

7 LITERATURA

1. Crawford DH. Principles and practice of clinical virology. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schaub BD, eds. Epstein- Barr virus. 5th ed. West Sussex, John Wiley&Sons; 2004. p. 123-45.
2. Koren S. Virusna onkogeneza. In: Koren S, Avšič ŽT, Drinovec B, Marin J, Poljak M. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 1998. p. 1-87.
3. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, eda. Medical microbiology. 22nd ed. New York: R. R. Donnelley& Sons; 2001. p 371-89, 513-15.
4. Murray PG, Lawrence SY. The Epstein-Barr virus genome. Expert Reviews in Molecular Medicine 2001; 1: 14–16.
5. Allen M, Young L, Dawson C. The Epstein-Barr Virus-Encoded LMP2A and LMP2B Proteins Promote Epithelial Cell Spreading and Motility. Journal of Virology. Feb 2005 Vol. 79, No. 3, 1789-1802.
6. Baumann R, Warren G, Askovic S. Restoration of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein's capacity to disrupt latency by the addition of heterologous activation regions. Virology. Aug 1, 1995 Vol. 211, No. 1, 64-72.
7. Beisser P, Verzijl D, Gruijthuisen Y, Beuken E, Smit M, Leurs R, Bruggeman C, Vink C. The Epstein-Barr Virus BILF1 Gene Encodes a G Protein-Coupled Receptor That Inhibits Phosphorylation of RNA-Dependent Protein Kinase. Journal of Virology. Jan 2005 Vol. 79, No. 1, 441-449.
8. Farrel PJ, Cludts I, Stuhler A. Epstein-Barr virus genes and cancer cells. Biomed Pharmacother 1997; 51: 258–67.
9. White DO. Mechanisms of viral oncogenesis. In: White DO, Fenner FJ. Medical Virology. San Diego: Academic Press; 1994. p. 170–90.
10. Gordis L. Epidemiology. 3rd ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company; 2004: 335.
11. Klemenc P, Marin J. Onkogeno delovanje herpesvirusov. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2003; 42: 165-75.
12. Marin J. Prispevek k poznavanju vloge virusa Epstein Barr v Sloveniji. Zdravniški vestnik, Ljubljana: 1990; 59: 405-8.
13. Leland DS. Clinical virology. 1st ed. W. B. Saunders Company; 1996. p. 106-14, 145-47.

14. Hess RD. Routine Epstein- Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective; Still Challenging after 35 Years. *Journal of Clinical microbiology*; 2004. p. 3381-87.
15. Vozelj M. Temelji imunologije. 1st ed. Ljubljana: DZS; 2000. p. 91-120.
16. Martins BT, Litwin MC, Hill RH. Evaluation of a Multiplex Fluorescent Microsphere Immunoassay for Determination of Epstein-Barr Virus Serologic Status. *American Society for Clinical Pathology* 2008; 129: 34-41.
17. Gartner B. C., Hess R.D., Bandt D., Kruse A., Rethwilm A., Roemer K. Evolution of four commercially available Epstein-Barr virus Enzyme Immunoassays with an Immunofluorescence Assay as the reference method. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003. p. 78-82
18. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM. *Manual of Clinical microbiology*. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, 2007: 1564-73.
19. Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije. 1st ed. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo; 2008. p. 298-326.
20. DiaSorin-LIAISON- EBV VCA IgM (310500). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin:5.
21. DiaSorin-LIAISON- EBV VCA IgG (310510). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin:5.
22. DiaSorin-LIAISON- EBV EA IgG (310520). Instructions. 2002. Saluggia, DiaSorin:5.
23. Plexus™, Focus Diagnostics: EBV IgM Multi- Analyte Diagnostics., 2008(MP0600M).
24. Plexus™, Focus Diagnostics: EBV IgG Multi- Analyte Diagnostics., 2008(MP0500G).
25. AtheNA Multi- Lyte®, Zeus Scientific: EBV VCA IgM PLUS Test System. 2008/09., (A92101M).
26. AtheNA Multi- Lyte®, Zeus Scientific: EBV IgG PLUS Test System. 2008/09., (A92101G).
27. Lothar T: *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results*, 1st ed, TH-Books, Frankfurt, 1998.
28. Adamič Š.: *Temelji biostatistike*. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995: 116-120.