

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA MALAVAŠIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA MALAVAŠIČ

KLINIČNI POMEN DOLOČANJA IZBRANIH BIOKEMIČNIH IN SEROLOŠKIH
MARKERJEV PRI DIAGNOSTIKI INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE

CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINATION SOME OF THE BIOCHEMICAL
MARKERS IN DIAGNOSTIC OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani pod mentorstvom **prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.** in somentorstvom **mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.**

KOMISIJA ZA OCENO IN ZAGOVOR:

Predsednik: **izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.**

Član: **doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.**

Mentor: **prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem.**

Somentorica: **mag. Elizabeta Božnar Alič, univ. dipl. bio., spec. med. biokem.**

ZAHVALA

Zahvala gre predvsem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju in somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič ter vsemu osebju na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, ki so mi bili v veliko pomoč in podporo pri izvedbi moje diplomske naloge.

Zahvaljujem pa se tudi vsem domačim, prijateljem in znancem ter vsem, ki ste mi na kakršen koli način pomagali, me spodbujali, svetovali, me poslušali, mi vlivali moči in poguma, me razumeli in prenašali...

Brez VAS mi ne bi USPELO

HVALA!

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo z naslovom **Klinični pomen določanja izbranih biokemičnih in seroloških markerjev pri diagnostiki infekcijske mononukleoze** opravila samostojno pod mentorstvom **prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.** in somentorstvom **mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.**

Nataša Malavašič

KAZALO

1. UVOD	1
1.1. BOLEZEN: Infekcijska mononukleoza	1
1.1.1 Klinična slika.....	1
1.1.2. Zapleti	2
1.1.3. Zdravljenje	2
1.2. POVZROČITELJ BOLEZNI: virus Epstein-Barr	3
1.2.1. Lastnosti virusov	3
1.2.2. Virus Epstein-Barr	3
1.2.3. Antigenске značilnosti virusa Epstein-Barr.....	4
1.2.4. Patogeneza in imunost	5
1.2.5. Imunski odziv na okužbo	7
1.2.6. Epidemiologija	8
1.3. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE.....	9
1.3.1. Nespecifični laboratorijski testi.....	9
1.3.2. Specifični laboratorijski testi	13
2. NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ	16
3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE.....	18
3.1. PREISKOVANCI	18
3.2. VZORCI.....	18
3.2.1. Kri	18
3.2.2. Serum.....	18
3.3. ANALIZNE METODE	19
3.3.1. Hemogram z diferencialno krvno sliko na hematološkem analizatorju	19
3.3.2. Mikroskopska diferencialna krvna slika.....	20
3.3.3. Določanje biokemijskih parametrov v serumu.....	24
3.3.4. Hitri test na heterofilna protitelesa.....	24
3.3.5. Serološki testi	26

3.4. STATISTIČNE METODE	34
3.4.1. Statistični testi	34
3.4.2. Občutljivost in specifičnost	35
4. REZULTATI	37
4.1. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN VREDNOTENJE PREISKOVANE SKUPINE	37
4.2. TEST NORMALNOSTI PORAZDELITVE PODATKOV	42
4.3. UGOTAVLJANJE RAZLIK PARAMETROV MED SKUPINO BOLNIKOV Z INFEKCIJSKO MONONUKLEOZO IN SKUPINO BOLNIKOV BREZ INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE	43
4.4. POVEZANOST HITREGA TESTA S STAROSTJO	44
4.5. KORELACIJA MED PARAMETRI	47
4.6. DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	48
5. RAZPRAVA	50
5.1. OPIS PREISKOVANE SKUPINE	53
5.2. PRIMERJAVA PARAMETROV MED BOLNIKI Z IN BREZ INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE	55
5.3. POVEZANOST HITREGA TESTA S STAROSTJO	56
5.4. KORELACIJA MED PARAMETRI	57
5.5. OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	58
6. SKLEPI	61
7. LITERATURA	62
PRILOGE:	a

KAZALO SLIK

Slika 1: Pordeli nebniči pokriti s pseudomembranami.....	2
Slika 2: Struktura virusa Epstein-Barr	4
Slika 3: Humoralni imunski odziv pri okužbi z EBV	7
Slika 4: Levo zgoraj navaden limfocit , okoli trije atipični limfociti	11
Slika 5: Princip direktne (»sendvič«) ELISA metode	14
Slika 6: Mikroskop.....	23
Slika 7: Reagenčni komplet Clearviw IM	25
Slika 8: Prikaz delovnega postopka izvajanja testa Clearview IM.....	26
Slika 9: Reagenčni komplet za določanje anti-EBNA IgG	29
Slika 10: Analizator VIDAS	30
Slika 11: Princip indirektne ELISA metode.....	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Predstavitev pomembnih beljakovin latentne faze in njihova funkcija.....	5
Preglednica II: Predstavitev izraženih genov pri različnih latentnih programih	6
Preglednica III: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBV VCA IgM27	
Preglednica IV: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM	27
Preglednica V: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBV VCA/EA IgG	28
Preglednica VI: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM	28
Preglednica VII: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBNA IgG	29
Preglednica VIII: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM.....	30
Preglednica IX: Interpretacija rezultatov analize encimsko fluorescenčnega imunskega testa VIDAS EBV VCA IgM	33
Preglednica X: Interpretacija rezultatov analize encimsko fluorescenčnega imunskega testa VIDAS EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG.....	33
Preglednica XI: Faza okužbe z EBV glede na rezultat vseh treh VIDAS testov – EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG.....	33
Preglednica XII: Rezultati deskriptivne statistike posameznih parametrov	37
Preglednica XIII: Predstavitev rezultatov hitrega testa in seroloških testov ter njihova interpretacija	41
Preglednica XIV: Rezultati testov normalnosti porazdelitve parametrov	42
Preglednica XV: Rezultati Mann-Whitneyeve statistike.....	44
Preglednica XVI: Prikaz kontingenčne tabele: zanesljivost hitrega testa * starost (mejna vrednost 4 leta).....	45
Preglednica XVII: Rezultati Fisher-jevega eksaktnega testa	46
Preglednica XVIII: Prikaz kontingenčne tabele: zanesljivost hitrega testa * starost (mejna vrednost 12 let)	46
Preglednica XIX: Rezultati Fisher-jevega eksaktnega testa.....	47
Preglednica XX: Občutljivost in specifičnost parametrov	48
Preglednica XXI: Občutljivost in specifičnost hitrega testa	49
Preglednica XXII: Občutljivost in specifičnost hitrega testa glede na starost	49

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz mejne vrednosti, specifičnosti in občutljivosti testa	36
--	----

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Pogostost simptomov, znakov in laboratorijskih kazalcev ter značilnosti pri infekcijski mononukleozii	a
Priloga 2: Referenčne vrednosti eritrocitne krvne slike	b
Priloga 3: Referenčne vrednosti levkocitne krvne slike	c
Priloga 4: Referenčne vrednosti trombocitne krvne slike	d
Priloga 5: Referenčne vrednosti biokemičnih markerjev IM	e
Priloga 6: Kvartilni diagrami: pregled razpršenosti podatkov pri posameznih parametrih.....	f
Priloga 7: Korelacija med posameznimi parametri 1/2	i
Priloga 7: Korelacija med posameznimi parametri 2/2	k

POVZETEK

Infekcijska mononukleoza (IM) je bolezen, ki nastane po primarni okužbi z virusom Epstein-Barr (EBV). Poleg splošnih simptomov in kliničnih znakov bolezni nam je laboratorijska diagnostika v veliko pomoč pri odkrivanju, dokazovanju in spremljanju bolezni.

Pri bolnikih s sumom na infekcijsko mononukleozo smo opravili osnovne hematološke preiskave z diferencialno krvno sliko, mikroskopski pregled krvnih razmazov, v serumu smo izmerili koncentracijo jetrnih encimov (aktivnosti AP, ALT, AST, γ -GGT) koncentracijo celokupnega in direktnega bilirubina in koncentracijo CRP ter opravili hitri test na heterofilna protitelesa. Vsi omenjeni testi se uporabljajo v rutinski diagnostiki za dokazovanje infekcijske mononukleoze. V okviru diplomske naloge smo preiskovancem izvedli še dodatne serološke teste, ki so bolj specifični in s katerimi smo bolezen IM nekaterim preiskovancem potrdili, drugim pa izključili.

V raziskavo je bilo vključenih 40 preiskovancev s sumom na okužbo z EBV. Osnovne hematološke preiskave so pri večini preiskovancev pokazale značilno krvno sliko s povečano koncentracijo levkocitov, med katerimi prevladujejo limfociti. V krvi preiskovancev smo v povprečju določili 25,6 % atipičnih limfocitov glede na število vseh levkocitov. Atipični limfociti so v tako visoki koncentraciji značilni za infekcijsko mononukleozo. Poleg značilne levkocitne krvne slike pa so nam pri diagnostiki v pomoč še jetrni encimi, ki so bili pri preiskovanih tudi značilno povečani. Na podlagi vseh teh parametrov pri značilnem poteku bolezni lahko že z veliko gotovostjo postavimo diagnozo. V našem primeru smo 82,5 % (33/40) preiskovancem diagnosticirali IM.

V rutinski diagnostiki se kot potrditveni test uporablja hitri test na heterofilna protitelesa, ki pa je slabše občutljiv pri otrocih. S pomočjo Fisherjevega eksaktnega testa smo ugotovili, da se nakazuje povezanost med točnostjo hitrega testa in starostjo, vendar te povezave nismo mogli dovolj zanesljivo potrditi ($p = 0,106$). Pri preiskovancih starih nad 12 let je hitri test zaznal 85,7 % bolnikov z IM, pri bolnikih, mlajših od 12 let, pa je bil odstotek bolnikov z IM samo 58,3 %.

Zaključimo lahko, da je diagnostika infekcijske mononukleoze relativno zanesljiva pri značilnem poteku bolezni in ob uporabi kombinacije vseh zgoraj omenjenih hematoloških in biokemičnih markerjev. Z našo raziskavo smo potrdili, da je občutljivost hitrega testa manjša pri otrocih mlajših od 12 let. Za še boljšo opredelitev povezave med starostjo

bolnikov z IM in točnostjo hitrega testa pa bi bile potrebne dodatne raziskave pri večjem številu bolnikov, mlajših od 12 let.

ABSTRACT

Infectious mononucleosis (IM) is a disease that is caused by a primary infection with virus Epstein-Barr. In addition to general symptoms and clinical signs of disease, laboratory diagnostics helped us to identify, demonstrate and monitor the disease.

Basic blood tests with differential count and microscopic examination of blood smears were performed on patients with suspected infectious mononucleosis. We also measured serum concentrations of liver enzymes (activities of AP, ALT, AST, γ -GGT), plasma levels of total and direct bilirubin, concentration of CRP and conducted rapid heterophile antibodies test. All of these tests are used in routine diagnostics to detect an infectious mononucleosis. A part of our investigation was an additional, more specific serological testing. With use of these serological tests we confirmed the disease with some patients and excluded it with others.

The study included 40 patients with a suspected EBV infection. With most patients, basic hematology showed an elevated blood cell count with increased white blood cells, where lymphocytes predominated. An average 25.6 % of atypical lymphocytes in relation to the total number of leukocytes was measured in the blood of the patients. In such high concentrations, atypical lymphocytes are specific for infectious mononucleosis. Besides the distinctive leukocyte blood count liver enzymes are also helpful at diagnostics, their level is normally elevated. Based on these parameters we can set a very accurate diagnosis in the typical course of the disease. In our case, we diagnosed 82.5 % (33/40) of the patients.

In routine diagnostics a rapid test for heterophile antibodies, which is less sensitive for children, is used as a confirmatory test. By means of a Fisher's exact test we ascertained that the relationship between the accuracy of rapid test and age is being indicated. This connection could however not be established with certainty ($p = 0.106$). The rapid test detected 85.7 % of patients with IM for patients aged over 12 years and only 58.3 % of patients with IM were under 12 years of age.

We can conclude that the diagnosis of infectious mononucleosis is relatively reliable at the typical course of disease and with use of combination of haematological and biochemical markers. According to our patients, our research also confirms that the sensitivity of a rapid test is lower with children aged under 12. We would however require additional researches on various patients, aged under 12, for a better definition of the relationship between age of patients with IM and accuracy of rapid test.

KLJUČNE BESEDE: Infekcijska mononukleoza, virus Epstein-Barr, atipični limfociti, heterofilna protitelesa, laboratorijska diagnostika

KEY WORDS: Infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus, atypical lymphocytes, heterophile antibodies, laboratory diagnosis

SEZNAM OKRAJŠAV

ALT	alanin-aminotransferaza
AP	alkalna fosfataza
AST	aspartat-aminotransferaza
CLIA	kemiluminiscenčni test (ang. Chemiluminescence Immunoassay)
CRP	C-reaktivni protein
CSF	kolonije stimulirajoči faktor (ang. colony-stimulating factor)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxiribonuclear acid)
EA	zgodnji virusni antigen (ang. early antigen)
EBER	EBV kodirana RNA (ang. Epstein-Barr virus encoded RNAs)
EBNA	jedrni antigen virusa Epstein-Barr (ang. Epstein-Barr nuclear antigen)
EBV	virus Epstein-Barr
EKG	elektrokardiogram
ELFA	encimsko-imunski test (ang. Enzyme Linked Fluorescent Assay)
ELISA	encimsko-imunski test (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
GGT	gama-glutamil-transferaza
HA	heterofilna protitelesa (ang. heterophile antibodies)
HSV	virus herpes simplex
IFA	imunofluorescenčna metoda (ang. immunofluorescence assay)
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
IL	interlevkin
IM	infekcijska mononukleoza
LMP	latentni membranski protein (ang. latent membrane protein)
MGG	barvanje po May-Grünwald-Giemsi
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonuclear acid)
VCA	virusni kapsidni antigen (ang. viral capsid antigen)
VCS	volumen, konduktivnost, odboj (ang. Volume, Conductivity, Scatter)

1. UVOD

1.1. BOLEZEN: Infekcijska mononukleoza

Infekcijska mononukleoza (IM) ali tudi žlezna vročina (ang.: glandular fever) [1] je akutna infekcijska bolezen, ki jo lahko povzročajo številne bakterije ali virusi, večinoma pa jo povzroča virus Epstein-Barr (EBV) [2]. Okužba zgodaj v otroštvu največkrat poteka v subklinični obliki ali se pojavijo nespecifični simptomi podobni angini [3]. Pri mladostnikih skoraj polovica vseh primarnih okužb z EBV poteka kot IM z značilnimi simptomi in kliničnimi znaki [1, 4, 5, 6].

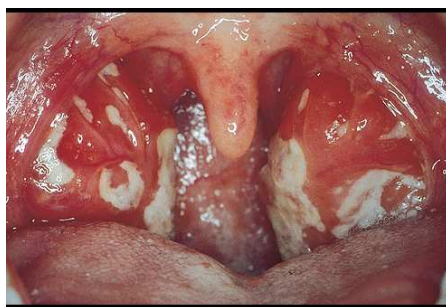
Bolezen se razvije zaradi intenzivnega odziva citotoksičnih limfocitov T, ki želijo odstraniti z EBV okužene celice [7, 8]. V periferni krvi se pojavi veliko število povečanih atipičnih limfocitov, imenovanih tudi Downeyeve celice [9]. V hematologiji pomeni izraz mononukleoza povečanje števila krvnih celic, ki nimajo segmentiranega jedra, in to so: limfociti, atipični limfociti, plazmatke in monociti. Izraz »infekcijska mononukleoza« tako izhaja iz teh celic [8].

IM je benigna bolezen, ki ponavadi izzveni sama. Večina bolnikov popolnoma okreva, zapleti so redki. Zaradi lastnosti, da EBV ostaja v organizmu vse življenje, lahko pride do ponovne reaktivacije virusa in tudi do kroničnega poteka bolezni [3].

1.1.1 Klinična slika

Pri infekcijski mononuklezi preteče od okužbe do pojava bolezenskih znakov od 30 – 50 dni [1, 2, 4]. Bolezen se največkrat začne z zvišano telesno temperaturo tudi do 40 °C ter z drugimi splošnimi simptomi okužbe, kot so utrujenost, rahel glavobol, slabost. Značilne so bolečine v žrelu in slabo počutje, nekateri pa občutijo tudi bolečino v trebuhu in v mišicah [1, 3]. Prav zaradi povišane telesne temperature in vnetja žrela bolniki poiščejo zdravniško pomoč [1]. Poleg splošnih simptomov okužbe se čez čas pojavijo značilni simptomi, ki se kažejo v obliki splošnega povečanja vseh limfnih žlez [3, 9]. Otekle so bezgavke na vratu in tudi drugje po telesu [3]. Pogosto sta povečani in pordeli nebnici, mnogokrat pokriti tudi z belkastimi oblogami (psevdomembrane) (slika 1) ali sluzastim izločkom [3, 10]. Pri nekaterih bolnikih je povečana tudi vranica, ki jo težje klinično odkrijemo [11]. Mehko nebo je lahko močno pordelo, vidne so pikčaste krvavitve. Velikokrat je prizadeta tudi nosna sluznica, ki je otekla in pordela, tako da je dihanje skozi nos oteženo [9]. Včasih so

pordele tudi očne veznice in pojavi se oteklina okoli oči. Ta klinični znak je specifičen za primarno okužbo z EBV [9]. Nekateri bolniki lahko potožijo zaradi otrdelosti desnega zgornjega dela trebuha, ki se pojavi zaradi pritiska povečanih hepatocitov na jetrno kapsulo. Klinični znaki in simptomi običajno trajajo teden ali dva, nato pa začne tretji teden temperatura padati in bolezenski znaki počasi izginejo[9].



Slika 1: Pordeli nebnici pokriti s pseudomembranami [13]

1.1.2. Zapleti

Pri infekcijski mononukleozi so zapleti izredno redki. Lahko so posledica vdora virusa v različna tkiva ali okvare imunosti [9]. Včasih se okrevanje od okužbe podaljša, utrujenost, rahlo zvišana telesna temperatura in povečane bezgavke pa vztrajajo več mesecev [4]. O kronični mononukleozi govorimo takrat, ko simptomi ne izginejo po 6 mesecih od pričetka bolezni [14]. Opisanih pa je tudi nekaj smrtnih primerov bolezni [3].

1.1.3. Zdravljenje

Zdravljenje infekcijske mononukleoze je simptomatsko. V akutni fazi bolezni se priporoča počitek, uživanje lahke hrane in dovolj tekočine. Za lajšanje bolečine in vročine se lahko uporabi paracetamol in nesteroidna protivnetna zdravila. Protivirusno zdravljenje z aciklovirom, ki preprečuje replikacijo virusa (inhibira virusno DNA polimerazo), zmanjša izločanje virusa, vendar ne vpliva na klinično sliko, zato ni priporočljivo [15]. Prav tako ni priporočljivo zdravljenje s kortikosteroidi. Uporabi se jih le v primeru zapleta bolezni, npr. če obstaja tveganje za obstrukcijo dihal, pri akutni hemolitični anemiji ter nekaterih srčnih zapletih ali nevroloških boleznih [3, 4, 5, 6, 16]. Prav tako je potrebno zdravljenje v bolnišnici le v primeru kadar poteka bolezen z zapleti [3].

1.2. POVZROČITELJ BOLEZNI: virus Epstein-Barr

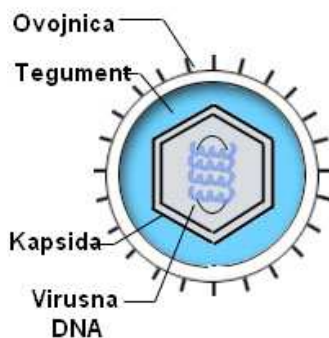
Infekcijsko mononukleozo povzroča virus Epstein-Barr (EBV), ki sodi v družino *Herpesviridae* - herpesvirusi [1, 2]. Človeški herpesvirusi so pomembna skupina DNA virusov. Infekcije s herpesvirusi so zelo pogoste, saj so ti virusi zelo razširjeni [4, 18]. Za vse herpesvire je značilno, da po okužbi ostanejo v organizmu vse življenje [2, 5, 6, 7]. Herpesvirusi povzročajo litične okužbe celic, kadar se njihov genom izrazi v celoti. Kadar je v celicah izražen le del njihovega genoma in je le ta prisoten v jedru celic v obliki zunajkromosomskih episomskih delcev, pa je okužba prikrita ali latentna [2, 3, 8, 11].

1.2.1. Lastnosti virusov

Virusi so obvezni znotrajcelični zajedavci, saj za svoje razmnoževanje nujno potrebujejo gostiteljsko celico [11]. V svoji zgradbi nimajo sistemov za sintezo lastnih beljakovin, manjkajo jim encimi za podvojevanje DNA, zato izkoriščajo gostiteljsko celico. Virusna DNA preusmeri gostiteljsko celično presnovo v izgradnjo sestavin za nastanek novih virusov [2, 17].

1.2.2. Virus Epstein-Barr

EBV natančneje uvrščamo med *Gammaherpesvirinae* in rod *Lymphocryptovirus* [3, 4, 17]. Mednarodni komite za taksonomijo virusov ga je poimenoval humani herpesvirus-4 (HHV-4) [4, 9]. Strukturno se ne razlikuje od drugih herpesvirusov [4]. Je kroglaste ali pleomorfne oblike s premerom 150–200 nm [3]. Zunanost tvori lipidna ovojnica, ki izvira iz membrane Golgijevega aparata okužene celice. Lipidna ovojnica vsebuje virusne glikoproteine, ki v obliki 8–10 nm dolgih bodic obdajajo virusno površino [3, 4]. Virus vsebuje dvojnovijačno linearno molekulo DNA, velikosti 184 kb parov, to je zapis za približno 100 beljakovin [1, 5]. Genom obdaja beljakovinski ikozaedrični plašč imenovan kapsida, ki je zgrajena iz 162 kapsomer [5]. Med kapsido in zunanjo ovojnico je beljakovinska plast, ki se imenuje tegument. V njem se nahajajo virusne beljakovine in encimi, ki sodelujejo pri podvojevanju [17].



Slika 2: Struktura virusa Epstein-Barr[21]

1.2.3. Antigenске značilnosti virusa Epstein–Barr

Antigene virusa delimo na tiste, ki se izražajo v litičnem ciklu, in iste, ki so del aktivnega genoma v latentnem ciklu.

1.2.3.1. Beljakovine litične faze

Med litično fazo infekcije, za katero je značilno nastajanje novih virusov, je virusni genom v linearni obliki. Izraženih je približno 100 genov [19], ki nosijo zapis za 80 beljakovin litične faze, med katere sodijo aktivatorji transkripcije ali prepisovanja genov, faktorji podvojevanja DNA in strukturne beljakovine virusa [20]. Z litično okužbo so tako povezani takojšnje zgodnje beljakovine ali beljakovine alfa, zgodnje beljakovine ali beljakovine beta in pozne beljakovine ali beljakovine gama [9, 17].

Na začetku litične faze se najprej izrazita takojšnja - zgodnja gena BZLF1 in BRLF1, ki sta pomembna za prehod iz latentne v litično fazo okužbe. Poleg tega aktivirata prepisovanje zgodnjih genov beta, ki izražajo zgodnje virusne antigene (ang. early antigens, EA). Ti imajo vlogo encimov, ki so udeleženi pri podvojevanju virusne DNA (timidin kinaza, DNA polimeraza, helikaza) [4, 20]. Nato sledi prepisovanje poznih genov, kateri vplivajo na sintezo virusnih beljakovin gama. Med pozne beljakovine spadajo strukturne beljakovine virusne kapside (ang. viral capsid antigens, VCA) in glikoproteini virusne ovojnice [4, 17].

1.2.3.2. Beljakovine latentne faze

Za latentno fazo okužbe je značilno, da se virusni genom ne vgradi v celično DNA, ampak je prisoten v jedru celic v obliki zunajkromosomskih genetskih delcev ali episomov [4, 9]. Med latentno fazo je izraženih le nekaj genov. Med njimi ločimo: šest različnih EBV

jedrnih antigenov (ang. EBV nuclear antigen – EBNA), tri različne latentne membranske beljakovine (ang. latent membrane protein – LMP), dve majhni ne-poliadelinirani RNA molekuli (EBER-1 in EBER-2) ter transkript za BamHI A regijo (BARTs) [9, 19]. Vloga beljakovin latentne faze je predstavljena v preglednici I.

Preglednica I: Predstavitev pomembnih beljakovin latentne faze in njihova funkcija [20]

Beljakovina	Funkcija
EBNA-1	vzdrževanje episoma in latentne okužbe, inhibicija apoptoze, uravnavanje prepisovanja DNA
EBNA-2	uravnavanje virusnih in celičnih genov pri celični transformaciji, pomemben pri prehodu limfocitov B v limfoblastoidne (nesmrtno) B celice
EBNA-3A	zaviranje delovanja EBNA-2, regulacija izražanja celičnih genov, transformacija B limfocitov
EBNA-3B	
EBNA-3C	
EBNA-LP	povečuje dejavnost EBNA-2 pri transaktivaciji LMP-1
LMP-1	preprečuje apoptozo, aktivira limfocite B, spodbuja preživetje limfocitov B
LMP-2A/2B	prepreči prehod v litično fazo virusa, omogoča vzdrževanje latence
EBER-1/2	vloga v okužbi z EBV še nejasna

1.2.4. Patogeneza in imunost

Primarna okužba z EBV se prične v epitelijskih celicah ustno – žrelnega prostora, kjer pride do razmnoževanja virusa in sproščanje novih virionov. Kasneje se razmnožuje zlasti v limfocitih B, kjer povzroča trajno latentno okužbo [22, 23, 24]. Redkeje se EBV pomnožuje v limfocitih T, dendritičnih celicah in makrofagih [1]. Virus lahko dolgo časa miruje v latentnem stanju. Do reaktivacije pride ponavadi pri imunsko oslabilih osebah [3]. V limfocitih B je virus prisoten vse življenje, poleg tega pa se iz njih razširi še v druga tkiva [11]. EBV je onkogeni virus, ki ga povezujejo s pojavom različnih vrst raka [4]. V genomu ima zapis za različne onkogene beljakovine, ki lahko aktivirajo celične onkogene ali inaktivirajo celične tumorje zavirajoče gene [11]. Virus tako transformira limfocite B, ki vsebujejo EBV genom in jih naredi nesmrtno [25].

1.2.4.1. Primarna infekcija in replikacija EBV

Virus vstopa v limfocite B s specifično vezavo virusnega glikoproteina gp350/220, izraženega na virusni ovojnici, s proteinom CD21 na površini limfocitov B [18, 20]. CD21 je tudi receptor za C3d komponento glavnega histokompatibilnega kompleksa razreda II

(HLA class II), ki sodeluje pri vezavi tako, da se veže z EBV gp42 [9, 20]. Virusna ovojnica se zlije s celično membrano in z zlitjem vstopa nukleokapsida in tegument v citoplazmo celice [2, 17]. Beljakovine tegumenta preprečijo sintezo celičnih beljakovin in sprožijo izražanje takojšnjih zgodnjih virusnih genov [4]. Po razgraditvi nukleokapside, prehaja virusni genom v jedro celice, kjer pride do podvojevanja z virusno DNA polimerazo [9]. Prepisovanje virusne DNA pa omogoči celična polimeraza RNA II v citoplazmi [4]. V jedru celice se sestavijo nukleokapside, ki skupaj s tegumentskimi beljakovinami izstopajo iz jedra. Ovojnico si virus pridobi z brstenjem skozi membrano Golgijevega aparata. Z eksocitozo pa se izločijo iz celice novi virusi [2, 17]. Tako se prične litičen cikel z izražanjem litičnih beljakovin in nastankom novih virionov, pri čemer lahko pride do lize celice, lahko pa celica tudi preživi [17].

EBV lahko okuži tudi epitelijske celice kljub temu, da nimajo CD21 receptorja. Pri tem sodelujejo integrini, ki pomagajo in se povežejo z EBV glikoproteinom ter tako omogočijo vstop virusa v epitelijske celice [9, 20].

1.2.4.2. Latentno stanje EBV

Latenca je stanje trajne, doživljenske virusne okužbe brez nastajanja novih virionov [9]. EBV genom ostaja v spominskih celicah kot episom. V tej fazi pride do izražanja latentnih genov, pri čemer se lahko razvijejo različne oblike latenc, ki so predstavljene v preglednici II.

Preglednica II: Predstavitev izraženih genov pri različnih latentnih programih [23]

Latentni programi	Izraženi geni
0	EBER, LMP-2A
I	EBER, EBNA1
II	EBER, EBNA1, LMP2A, LMP1
III	EBER, EBNA1, LMP2A, LMP1, EBNA2, EBNA3, EBNA-LP

1.2.4.3. Reaktivacija EBV

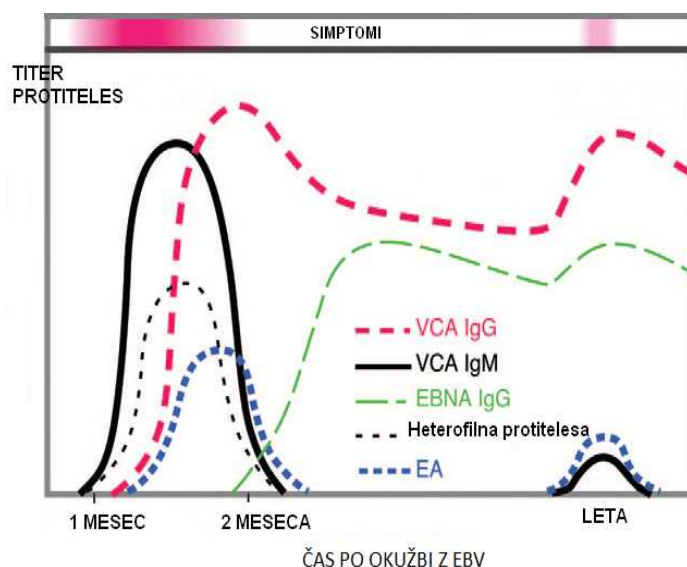
Latentno okuženi limfociti B lahko virus ponovno stimulirajo, da postanejo reaktivni in se pričnejo ponovno deliti. Kljub temu, da so poznane mnoge poti reaktivacije virusa, še vedno ni znano kaj sproži aktivacijo limfocitov B in vivo. Domnevajo, da lahko pride do reaktivacije EBV ob neznani okužbi. B celični receptor se pri tem stimulira, kar sproži aktivacijo vseh B limfocitov [9].

1.2.5. Imunski odziv na okužbo

Med primarno virusno infekcijo se sproži močan celični in humoralni imunski odziv. Človeški imunski odziv nadzoruje potek bolezni, vendar okužbe ne odpravi, saj virus ostaja v organizmu vse življenje [2, 9]. Latentni virus tako predstavlja nekakšen barometer imunske obrambe organizma [3].

1.2.5.1. Humoralni imunski odziv

EBV povzroča proliferacijo limfocitov B v prvem in drugem tednu bolezni, kar sproži aktivacijo plazmatk. Plazmatke sintetizirajo in začnejo izločati specifična protitelesa proti virusnim antigenom [3, 4]. Humoralni imunski odziv je z izločanjem specifičnih protiteles pomemben dejavnik pri diagnostiki EBV okužbe [5].



Slika 3: Humoralni imunski odziv pri okužbi z EBV [26]

Čeprav vsebuje EBV genom veliko genov za strukturne in nestrukturne virusne beljakovine, so za diagnostiko pomembni samo VCA, EA in EBNA [27].

Na začetku bolezni pride do hitrega porasta protiteles proti virusnem kapsidnem antigenu razreda IgM (anti-VCA IgM), ki po približno 2 mesecih upadejo. Po poteku 2 – 4 mesecev vsi bolniki razvijejo tudi anti-VCA IgG, ki ostanejo v organizmu vse življenje [3, 9]. IgG protitelesa proti EBNA se pri večini razvijejo po 3 mesecu bolezni, vendar ko se enkrat pojavijo prav tako ostanejo doživljensko [9]. Protitelesa proti EA so tudi prisotna in jih določimo v serumu, vendar niso tako specifična za določeno fazo poteka bolezni, zato niso tako uporabna pri diagnostiki infekcijske mononukleoze [1, 9].

1.2.5.2. Celični imunski odziv

Celično posredovana imunost ima pomembno vlogo pri nadzoru virusnega podvojevanja, vendar lahko prevelik celični odziv vodi k resnim simptomom IM. Pri celičnem imunskem odgovoru sodelujejo limfociti T (CD4+, CD8+ in celice ubijalke), ki se intenzivno odzovejo na primarno EBV okužbo in proliferacijo B limfocitov [20, 28]. V začetku okužbe prevladujejo CD8+ T celice ubijalke. Te so specifične za litične antigene in neposredno uničujejo tujke tako, da povzročijo lizo celice [6, 28]. Aktivirani CD8+ T limfociti sprožijo nastanek limfocitoze in atipičnih limfocitov, ki se pojavijo v periferni krvi bolnikov. Pri dovolj intenzivnem odzivu aktiviranih T celic se razvije bolezen IM s tipičnimi simptomi in znaki [9, 20].

1.2.6. Epidemiologija

EBV je zelo razširjen virus. Zaradi vzpostavitve doživljenske infekcije, prevalenca okužbe z EBV z leti narašča [1]. Več kot 90 % odrasle človeške populacije je tako okuženih z EBV [5, 11]. EBV se prenaša s tesnim stikom, najpogosteje z izmenjavo sline. Majhni otroci zelo radi dajejo igrače in druge predmete v usta, kar je lahko vir primarne okužbe. Slina se prenaša tudi med poljubljanjem, zato so infekcijsko mononukleozo nekateri poimenovali kar »bolezen poljuba« ali »kissing disease« [1, 3]. Poleg prenosa s slino, se lahko EBV prenese s transfuzijo krvi ali presaditvijo organov, saj se virus nahaja v periferni krvi, natančneje v spominskih limfocitih B [9]. Okužba pa se lahko prenaša tudi s spolnim stikom, saj so EBV našli v genitalnih izločkih [1, 2, 9, 11, 29].

Značilno za EBV okužbo je, da ni opaznega sezonskega poteka bolezni [3, 6, 9]. Oba serotipa EBV neprestano krožita v populaciji, zato bolnike srečujemo celo leto. Po končani bolezni pa lahko bolnik izloča virus še 18 mesecev [3, 9]. Možnost okužbe je torej stalna, vendar mora priti do tesnega stika [4].

Epidemiologija bolnikov s primarno okužbo z EBV je odvisna od starosti [29]. Čeprav se bolezen pojavlja pri bolnikih različne starosti, pa je pri otrocih mlajših od 4 leta starosti infekcijska mononukleaza zelo težko prepoznavna [1]. Bolezen je pri otrocih mlajših od 4 let ponavadi asimptomatska [1], poleg tega pa so pri teh bolnikih testi, ki se jih ponavadi uporablja v rutinski diagnostiki manj zanesljivi [30].

Čas primarne okužbe je močno vezan na socialno – ekonomske okoliščine. V deželah v razvoju se primarna okužba z EBV pojavi v zgodnjem otroštvu [3]. V osrednji Afriki so skoraj vsi otroci do 3 leta starosti okuženi z EBV. Okužba je asimptomatska [1, 3]. V

nasprotju z državami v razvoju, je v razvitih državah primarna infekcija v otroštvu manj pogosta zaradi višjih higienskih standardov. Z EBV pridejo v stik pozneje, navadno v starosti 15 do 24 let. Okužba od 50 % do 74 % mladih ljudi pa poteka s klinično sliko infekcijske mononukleoze [1, 3, 11, 20].

1.3. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE

Diagnozo infekcijske mononukleoze lahko postavimo na podlagi pogovora z bolnikom ter podrobnega telesnega pregleda bolnika v primeru specifičnih kliničnih znakov. Opravimo tudi nespecifične laboratorijske teste za potrditev diagnoze, pri nekaterih pa tudi specifične serološke teste za spremljanje poteka bolezni [31].

Prepoznavanje infekcijske mononukleoze je enostavno, kadar poteka bolezen z značilno in povsem izraženo klinično sliko [3, 9]. Vendar je treba poudariti, da diagnoze infekcijske mononukleoze ne moremo zagotovo potrditi izključno na podlagi značilnih kliničnih znakov. Lahko jo diagnosticiramo na podlagi značilne klinične slike in tipičnega laboratorijskega izvida osnovnih hematoloških preiskav z diferencialno krvno sliko [9]. Pri diagnostiki infekcijske mononukleoze se spremlja tudi nekatere biokemične parametre, ki sami po sebi niso specifični za določeno bolezen, v kombinaciji s prej omenjenimi testi, pa so nam v pomoč pri postavitvi diagnoze [32]. Okužbo z virusom EBV lahko laboratorijsko potrdimo s hitrim testom na heterofilna protitelesa. Serološke metode za dokaz specifičnih protiteles proti EBV veljajo za metodo izbora pri neznačilnem poteku bolezni [27].

1.3.1. Nespecifični laboratorijski testi

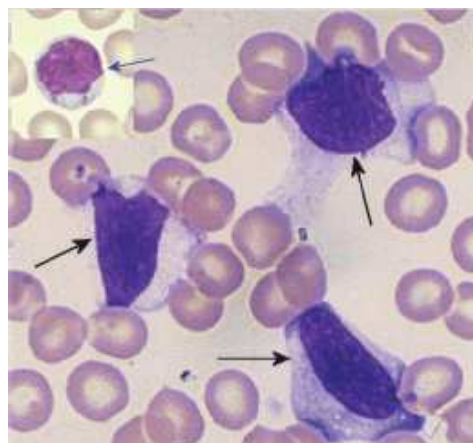
1.3.1.1 Hemogram in diferencialna krvna slika

Različne bolezni in okužbe se velikokrat pokažejo s spremembami v krvi. Krvna slika ali hemogram je laboratorijski rezultat preiskave krvi, pri kateri kvantitativno in kvalitativno določimo celice v periferni krvi. Razdelimo jo na eritrocitno, levkocitno in trombocitno krvno sliko. Avtomatizirano analizo krvnih celic omogočajo hematološki analizatorji [32]. Mikroskopsko diferencialno krvno sliko izvajamo z namenom diagnostike v primeru zmanjšane oziroma povečane številčne koncentracije levkocitov in v primerih, ko nam hematološki analizator javi prisotnost nezrelih ali atipičnih krvnih celic. Z diferenciacijo na posamezne vrste levkocitov dobimo relativne in absolutne koncentracije levkocitov ter opisujemo morfološke značilnosti levkocitov – obliko, velikost, razčlenjenost jeder, granulacije in druge vključke v citoplazmi [30].

Pri infekcijski mononukleози se pojavijo tipične spremembe krvne slike [2]. Številčna koncentracija levkocitov je v prvih dneh bolezni lahko zmanjšana, nato pa običajno poraste tudi do $18 \times 10^9/L$ [30]. Značilna je proliferacija mononuklearnih celic, predvsem limfocitov – limfocitoza [1, 6]. Pri limfocitozi je limfocitov več kot $4 \times 10^9/L$. Zmerna limfocitoza se pojavi pri IM, v rekovalescenci po akutni okužbi pa blaga limfocitoza [1, 33]. V krvi bolnikov z IM je opazna tudi zmerna monocitoza (v krvi je več kot $0,8 \times 10^9/L$ monocitov) ter blaga monocitoza v obdobju okrevanja po akutni okužbi [33]. Monociti in limfociti so prisotni tako v krvi kot tudi v različnih organih, najpogosteje v vranici in bezgavkah, pa tudi v jetrih, srcu, možganih, ledvicah, trebušni slinavki in kostnem mozgu [1, 3, 34]. Med limfociti opazimo več kot 10 % [33] pa tudi do 30 % atipičnih celic T limfocitne vrste, ki so morfološko spremenjene [3]. Po obliki in velikosti so te celice zelo različne, in ta različnost je najznačilnejši pojav pri bolezni [3]. Ti atipični limfociti (slika 4) so večji, s premerom od 15–30 μm [35] in imajo obilno, prosojno citoplazmo, ki je na zunanjem robu bazofilna [36]. Jedro je lahko ovalno, okroglo ali lobulirano in je pomaknjeno na rob celice [8, 33]. V jedru sta 1 do 2 jedrci. Kromatin je rahlejši ali grudast [30]. Ob stiku atipičnega limfocita z drugo celico, ima citoplazma atipičnega limfocita na stiku valovite robove [8]. Atipične limfocite lahko opazimo pri številnih drugih obolenjih, kot so ošpice, hepatitis, rdečke, mumps, toksoplazmoza, preobčutljivostne reakcije [1, 3], vendar jih je pri infekciji z EBV bistveno več [1, 3].

Infiltrati mononuklearnih celic so v vranici in limfnih žlezah tako intenzivni, da je porušena njuna zgradba. Tudi ovojnica vranice je lahko infiltrirana s temi celicami, kar vodi do krvavitve v vranico ali celo do njenega raztrganja. Limfoidno tkivo v žrelu in nebnicah je polno atipičnih limfocitov, kar lahko vidimo po oblogah odmrlega tkiva na nabnicah. Infiltrati v jetrih se pojavijo predvsem v periportalnih poljih, arhitektura lobusov ostane normalna. Ni znakov generalizirane parenhimske okvare [3].

Spremembe drugih celičnih linij so precej pogoste. Pri 60–90 % se pojavi relativna in absolutna nevtropenija - zmanjšana koncentracija nevtrofilcev v krvi. Nevtrofilci imajo prisotne toksične granulacije, aktivnost nevtrofilne alkalne fosfataze je zmanjšana [8]. Pogosto je nevtropenija blaga, z okoli $2,0\text{--}3,0 \times 10^9/L$ vseh granulocitov.



Slika 4: Levo zgoraj navaden limfocit , okoli trije atipični limfociti [37]

Pojavi se tudi trombocitopenija - zmanjšana številčna koncentracija trombocitov v krvi, pri tretjini pacientov je v krvi prisotnih manj kot 200×10^9 trombocitov/L krvi. Redko se pojavi huda trombocitopenija, najverjetneje zaradi perifernega uničenja trombocitov [1, 8].

1.3.1.2. Biokemični kazalci

Več kot 90 % bolnikov z infekcijsko mononukleozo ima znatno povečane vrednosti jetrnih encimov, ki kažejo na prehodno poškodbo jeter [3, 7, 9, 12]. Funkcija jeter, ocenjevanje nepravilnosti v delovanju jeter in celične integritete se preverja z določanjem aktivnosti jetrnih encimov (ALT, AST, AP, GGT) in določanjem koncentracije celokupnega in direktnega bilirubina, saj ima večina bolnikov z IM patološke jetrne teste [3, 33]. Vrednosti serumskih transaminaz (ALT in AST), ki kažejo na okvaro hepatocitov, so nekoliko povečane - dva do trikrat večje od normalne vrednosti. Povečane vrednosti ALT in AST se pojavi pri 80 % bolnikov [7]. Holestaza jeter, ki se kaže s povečanimi vrednostmi serumske alkalne fosfataze (AP) in bilirubina, je redka. Redko se pojavi tudi zlatenica, pri približno 5,0 – 6,6 % bolnikov [7, 12].

Pri pacientih se določa tudi koncentracija serumskega CRP. CRP je beljakovina akutne faze vnetja, ki nastaja v jetrih pod vplivom citokinov. Določanje vrednosti CRP spada med temeljne preiskave za razlikovanje med bakterijskimi in virusnimi okužbami, čeprav ne gre za jasno mejo, ki bi natančno razlikovala med posameznimi vrstami okužb [33]. Koncentracija CRP se opazno poveča pri bakterijskih okužbah, ni pa to specifično zanjo. Pri virusnih okužbah praviloma ni tolikšnega povečanja CRP [38]. Iz literature smo našli podatek, da je pri vrednostih CRP nad 40 mg/l malo verjetna izključno samo virusna okužba brez prisotnosti bakterij [39].

1.3.1.3. Heterofilna protitelesa

Heterofilna protitelesa so protitelesa razreda IgM, ki niso specifično usmerjena proti EBV, ampak imajo lastnost, da aglutinirajo živalske eritrocite [3, 35]. Heterofilna protitelesa prav tako niso specifična izključno za bolnike z IM. Našli so jih tudi pri bolnikih z drugimi infekcijami, malignimi in avtoimunimi boleznimi [9, 40].

Heterofilna protitelesa se v krvi pojavijo pri 85 % bolnikov z IM v prvih sedmih dneh po nastopu simptomov (slika 3). Koncentracija v krvi postopoma narašča, dokler ne doseže vrha med drugim in petim tednom bolezni. Detektiramo jih lahko še 12 mesecev po akutni okužbi [10].

Heterofilna protitelesa dokazujemo s hitrim aglutinacijskim testom ali Paul-Bunnellovo reakcijo [4]. Originalni test temelji na reakciji aglutinacije bolnikovega seruma ali plazme z ovčjimi ali govejimi eritrociti [6, 26]. Danes jih dokazujemo z aglutinacijo specifično obdelanih lateksnih delcev na ploščici, kamor so nanešeni goveji eritrociti [35]. Komercialno dosegljivi monotest za dokaz heterofilnih protiteles je nekoliko bolj občutljiv in specifičen kot klasični test aglutinacije eritrocitov [41, 42]. Monotest pa ima v primerjavi s specifičnimi serološkimi testi manjšo občutljivost in specifičnost [42]. Na voljo je več različic monotestov različnih proizvajalcev.

Diagnozo IM v primeru značilne klinične slike potrdimo s pozitivnim testom na heterofilna protitelesa [42, 43]. Vendar pa v nekaterih primerih obstaja potreba po specifičnih laboratorijskih testih, še posebej, ko se bolezen kaže z atipično klinično sliko in ko je test na heterofilna protitelesa negativen [27, 41, 42]. Pri polovici obolelih otrok pod starostjo 4-ih let heterofilnih protiteles ne moremo dokazati, saj jih ti otroci ne razvijejo [1, 9, 44, 45]. Pri odraslih pa je test negativen le v 10 % [3, 35]. Tako je lahko test na heterofilna protitelesa lažno negativen [9]. Poleg tega pa je test na heterofilna protitelesa nekoliko manj občutljiv, še posebej prvi teden bolezni [6]. Lažno negativni rezultat hitrega testa na heterofilna protitelesa se lahko pojavi prvi teden bolezni pri več kot 25 % bolnikov, drugi teden približno 5–10 % ter tretji teden bolezni samo še pri 5 % bolnikov [6]. Pri več kot 25 % bolnikov z IM pa je heterofilnih protiteles v prvem tednu bolezni pod mejo detekcije, zato jih z monotestom ne zaznamo [10]. V takih primerih se za potrditev primarne EBV infekcije uporablja serološka diagnostika. S serološkimi testi dokazujemo v serumu bolnika prisotnost različnih specifičnih protiteles proti EBV. Glede na značilni vzorec protitelesnega odziva lahko ugotovimo, v kateri fazi okužbe je bolnik [4, 35, 41].

1.3.2. Specifični laboratorijski testi

Ker EBV virus v gostitelju povzroči specifičen protitelesni imunski odziv, je virusne okužbe mogoče dokazovati na posreden način, z ugotavljanjem specifičnih protiteles v bolnikovem serumu [35]. Obstajajo tudi neposredne metode dokazovanja EBV, katere se pri diagnostiki IM le redko kdaj uporabljajo [26]. Med neposredne metode sodijo: izolacija EBV iz sline, osamitev virusa v celični kulturi, dokazovanje virusne DNA z verižno reakcijo s polimerazo oziroma PCR tehnika, dokazovanje virusa v tkivih s histološkimi preparati in elektronsko mikroskopijo [35, 46]. Te metode se uporabljajo pri okužbi EBV imunsko oslabeledih ljudi ter pri EBV okužbi povezani z nastankom raka [26].

1.3.2.1. Določanje specifičnih protiteles proti EBV

Zaradi dokaj pogostih lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov hitrega testa na heterofilna protitelesa, se za dokaz okužbe z EBV uporabljajo serološki testi [4]. V serumu bolnikov najpogosteje dokazujemo prisotnost protiteles razreda IgM in IgG proti VCA, EA in EBNA antigenom, saj so le ta najbolj uporabna pri postavitvi diagnoze in pri spremljanju bolezni [1].

Specifična protitelesa proti EBV lahko dokazujemo z različnimi metodami in tehnikami. Najpogosteje se v rutinski diagnostiki uporabljajo posredna imunofluorescenčna metoda (IFA – Indirect Immunofluorescence Assay), različne tehnike encimsko imunske metode – sem spadajo ELISA in njej sorodni kemiluminiscenčna metoda (CLIA) in ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) ter metoda Western blot. IFA velja za »zlati standard« pri EBV serološki diagnostiki. V kliniki se največkrat poslužujemo encimsko-imunskih metod, Western blot metoda pa se uporablja kot potrditveni test [27, 43, 47, 48].

Metoda posredne imunofluorescence

Metoda posredne imunofluorescence je zelo hitra, specifična in občutljiva. Ocena rezultata je subjektivna, zato so za njeno izvajanje in predvsem vrednotenje obvezne dolgoletne izkušnje mikroskopiranja. Primerna je predvsem za uporabo v preiskavah, ki jih izvajamo redko in v manjših serijah vzorcev [33, 48].

IFA se pogosto uporablja za detekcijo EBV specifičnih protiteles prav zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti. Zaradi intenzivnega in natančnega dela pri izvajanju metode, dobro usposobljenih in izkušenih izvajalcev, izvajanje analize pri manjših serijah vzorcev

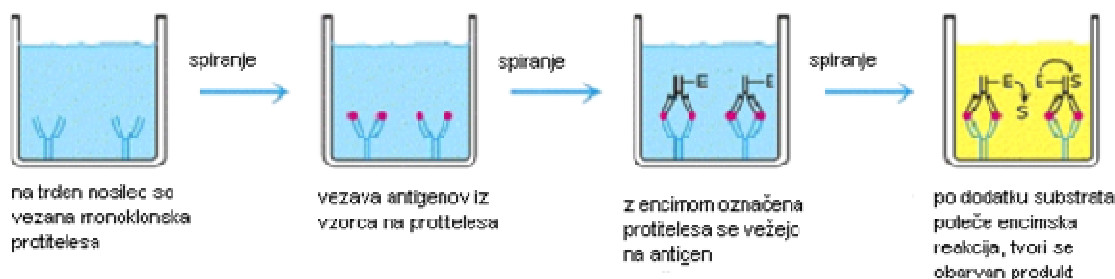
nezmožnost avtomatizacije in standardizacije pa se v večjih laboratorijih poslužujejo drugih alternativnih metod [26, 47].

Encimsko-imunska metoda

Encimsko-imunska metoda na trdni podlagi (ELISA) je v virologiji danes med najboljšimi in najbolj uporabnimi imunskimi testi. Obstajajo številne različice metode, ki izkoriščajo dejstvo, da je mogoče na protitelesa vezati encim, ne da bi ta izgubil svojo aktivnost in ne da bi protitelo izgubilo sposobnost vezave s svojim specifičnim antigenom [33, 35]. Najpogostejše so protitelesa označena z alkalno fosfatazo, glikoza-6-P-dehidrogenazo ali peroksidazo. Njihovi substrati so lahko kromogeni, fluorogeni ali luminiscenčne spojine [33]. ELISA ima številne prednosti v primerjavi z drugimi metodami. Zaradi enostavnosti in občutljivosti metode je zanesljiva in primerna za presejalne preizkuse velikega števila vzorcev [35, 49].

Glede na to ali v vzorcu določamo protitelesa ali antigene razdelimo ELISA metodo na:

- DIREKTNA ELISA se praviloma uporablja za določanje antigenov v vzorcu. Sendvič ELISA je zelo uporabna zaradi visokih specifičnosti in občutljivosti ter enostavnosti. V tej različici z visoko specifičnim ali monoklonskim protitelesom prekrijemo površino in ga izpostavimo antigenu iz vzorca. Na imunski kompleks vežemo dodana označena in specifična humana protitelesa, ki jih po dodatku substrata kvantitativno določimo in preko tega sklepamo na vsebnost analita v vzorcu. Lahko pa imunskemu kompleksu najprej dodamo neoznačena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na antigen. Šele nato dodamo označena protitelesa proti sekundarnim protitelesom ter dodatek substrata in končna detekcija [49].



Slika 5: Princip direktne (»sendvič«) ELISA metode [50]

- INDIREKTNA ELISA se uporablja za določanje protiteles v vzorcu.

Osnove reakcije so na trden nosilec vezani antigeni, ki so lahko nativni ali rekombinantni. V vdolbinice ploščice naneseemo razredčino bolnikovega seruma in ustrezne pozitivne in negativne kontrolne vzorce in inkubiramo. Po inkubaciji dobro speremo nevezana ali nespecifična vezana protitelesa. V drugem koraku dodamo sekundarna (anti – humana IgG ali IgM) z encimom označena protitelesa. Po inkubaciji in spiranju dodamo za encim ustrezen substrat. Reakcijo po nekaj minutah kemično ustavimo z inaktivacijo encima. Iz količine razgrajenega barvnega substrata, ki jo izmerimo s fotometrom po končani reakciji, sklepamo na količino protiteles v serumu. Metoda je zelo občutljiva in specifična, primerna za avtomatizacijo in izvajanje velikega števila preiskav v večjih ali manjših serijah [47, 51, 52].

Dandanes je na voljo veliko različnih, že pripravljenih diagnostičnih kompletov od različnih proizvajalcev. Potek ELISA metode je prav tako avtomatiziran in praktično vse korake izvede analizator sam. V mnogih študijah je bilo dokazano, da sta ELISA in njej podobna (CLIA) metodi dobri alternativni IFA metodi [51, 53].

Metoda imunoblot (western blot)

Metoda western blot je splošno sprejeta analizna tehnika s katero dokazujemo protitelesa proti natančno določenim antigenom virusa. Virusne beljakovine najprej ločimo v poliakrilamidnemu gelu z elektroforezo in jih prenesemo na nitrocelulozno membrano. Specifična protitelesa v serumu se vežejo na virusne beljakovine na membrani. Po dodatku označenih sekundarnih protiteles poteče encimsko-immunska reakcija, ki se kaže kot obarvanje različnih pasov na membrani. Western blot uporabljamo v seroloških tehnikah kot potrditveno metodo pri kritičnih okužbah [35].

2. NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ

Infekcijska mononukleoza pri otrocih največkrat poteka v subklinični obliki s simptomi podobnimi angini. Pri mladostnikih se okužba z EBV kaže s tipičnimi simptomi in znaki značilni za infekcijsko mononukleozo. Diagnostika je enostavna pri značilni klinični sliki. V rutinski diagnostiki se poleg hemograma in diferencialne krvne slike uporablja še hitri aglutinacijski test na heterofilna protitelesa kot potrditveni test. V številnih znanstvenih člankih navajajo slabšo občutljivost testa na heterofilna protitelesa pri otrocih, še posebej pri otrocih mlajših od 4 let. Zato se pri zapletenih primerih bolj zanesemo na specifične serološke metode.

Namen naše raziskave je bil, da opredelimo in potrdimo nekatere hematološke, biokemične in serološke markerje, na katerih temelji diagnostika infekcijske mononukleoze. S serološkimi testi bomo potrdili diagnostiko in opredelili potek bolezni pri preiskovancih. Iskali bomo morebitne razlike med bolniki z in bolniki brez IM. Poleg tega bomo bolnike razdelili glede na starost v dve skupini in iskali statistično pomembne razlike glede na starost in točnost hitrega testa na heterofilna protitelesa. Primerjali bomo tudi občutljivost testa na heterofilna protitelesa med skupinama ter izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost vsem izbranim markerjem.

Naše domneve so:

1. Pri vseh bolnikih z infekcijsko mononukleozo bo opazna značilna levkocitna krvna slika s povečano številčno koncentracijo levkocitov.
2. Pri značilni diferencialni krvni sliki bolnikov z infekcijsko mononukleozo pričakujemo absolutno in relativno limfocitozo.
3. Atipičnih limfocitov bo več kot 10 %.
4. Pri bolnikih z infekcijsko mononukleozo bodo povečane koncentracije določenih jetrnih encimov.

5. Koncentracija serumskega CRP pri bolnikih z infekcijsko mononukleozo ne bo presegla 40 mg/L.
6. Pri skupini otrok pod 4 – mi leti starosti bo manjša občutljivost testa na heterofilna protitelesa v primerjavi s skupino mladostnikov in odraslih nad 4 – mi leti starosti.
7. Diagnostika infekcijske mononukleoze je bolj specifična s serološkimi testi, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa proti EBV.
8. Serološki testi, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa proti VEB, nam služijo kot pomoč pri diagnostiki pri bolj kompleksnem in neznačilnem poteku bolezni. Glede na značilen vzorec protitelesnega odziva bomo lahko ugotovili v kateri fazi okužbe je bolnik, kar je pomembno pri spremljanju njegovega zdravljenja.

3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE

3.1. PREISKOVANCI

V prospektivno raziskavo smo vključili bolnike, ki so bili ali hospitalizirani (1 bolnik sprejet v oddelek za odrase in 9 bolnikov sprejetih v otroški oddelek) ali obravnavani v urgentni ali specialistični ambulantni (17 odraslih in 13 otrok) Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja, zaradi suma na bolezen infekcijske mononukleoze v časovnem obdobju marec 2011 – julij 2012. Pri vseh so bile opravljene osnovne hematološke in biokemijske preiskave, ki se običajno določajo pri teh bolnikih. Poleg osnovnih preiskav, pa smo opravili še dodatna testiranja za namen diplomskega dela.

3.2. VZORCI

Vzorci krvi niso bili odvzeti v raziskovalne namene. Bolnikom s sumom na okužbo z virusom Epstein-Barr oz. infekcijsko mononukleozo so bili, poleg ostalih zahtevanih laboratorijskih preiskav, ki se izvajajo pri bolnikih, opravljeni še dodatni serološki testi za dokazovanje specifičnih protiteles proti EBV.

3.2.1. Kri

Vzorci krvi za hematološke, biokemične in serološke preiskave so bili odvzeti na dan sprejema bolnika v bolnišnico oz. na dan hospitalizacije.

Vzorci za hematološke preiskave so odvzele diplomirane medicinske sestre na oddelkih ali v specialistični ambulantni v sterilne vakuumске epruvete, ki vsebujejo sredstvo proti strjevanju krvi – antikoagulant K₃EDTA, trikalijev edetat (proizvajalec Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija). Vzorce krvi smo nato brez predhodne priprave uporabili za določanje osnovnih hematoloških preiskav. To je za hemogram in diferencialno krvno sliko.

3.2.2. Serum

Vzorci za biokemične in serološke preiskave so diplomirane medicinske sestre odvzele v vakuumске epruvete brez antikoagulanta z dodatkom aktivatorja koagulacije (proizvajalec Laboratorijska tehnika Burnik, Slovenija). Za pridobitev seruma je potrebno vzorce najprej centrifugirati 10 min pri 3000 vrtljajih/min. Serum je tekoča frakcija krvi, kateri so

odstranjene krvne celice, fibrin in drugi faktorji, ki so udeleženi pri procesu strjevanja krvi oz. krajše serum je plazma brez fibrinogena [15]. Za določanje aktivnosti jetrnih encimov, določanje koncentracije direktnega in celokupnega bilirubina ter koncentracije CRP je bil serum takoj uporabljen za analize. Analize biokemijskih parametrov so bile izvedene v UKC Ljubljana KIKKB v 24 – urnem laboratoriju. Preostanek seruma smo shranili v eppendorf epruvete v zamrzovalnik na -20°C . Za izvedbo hitrega testa na heterofilna protitelesa ter določitev specifičnih seroloških markerjev smo serum kasneje odmrznili na sobno temperaturo.

3.3. ANALIZNE METODE

3.3.1. Hemogram z diferencialno krvno sliko na hematološkem analizatorju

S pomočjo hematološkega analizatorja smo določili osnovne parametre levkocitne, eritrocitne in trombocitne krvne slike: številčno koncentracijo levkocitov, eritrocitov in trombocitov, masno koncentracijo hemoglobina, vrednost hematokrita, povprečni volumen eritrocita, povprečno količino in povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih, heterogenost eritrocitov, povprečni volumen trombocitov in njihovo heterogenost v krvnem vzorcu. Hematološki analizator opravi analize hitro in iz majhne količine krvi.

3.3.1.1. Instrumenti in oprema

- Hematološki analizator Coulter HmX (Becton Coulter)
- Valjni mešalec - Roller 5 (Elkom Elektromedicina)

3.3.1.2. Princip metode

Na hematološkem analizatorju Coulter HmX poteka štetje in ocena lastnosti krvnih celic avtomatično z električnim in optičnim načinom detekcije, uporabljena sta Coulterjev princip in VCS tehnologija.

Coulterjev princip je elektronska metoda za štetje in merjenje delcev, ki poteka na principu zaznavanja in merjenja sprememb električnega toka, ko delci (celice, ki so slabi prevodniki) v prevodni tekočini potujejo skozi majhno odprtino v številni kapilari. Številčna koncentracija in volumen levkocitov, eritrocitov in trombocitov se določi z merjenjem električnega upora, ki ga tvorijo posamezne celice v prevodni raztopini. Število sprememb upora v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe upora je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celic.

VCS tehnologija je metoda, ki se uporablja za razvrščanje levkocitov na posamezne podvrste na podlagi električnih in optičnih meritev. Volumen (VOLUME) se določi po zgoraj opisanem Coulterjevem principu. Meritev prevodnosti elektromagnetnega toka visoke frekvence (CONDUCTIVITY) skozi celico, nam da informacije o razmerju med jedrom in citoplazmo, gostoti jedra in zrnih v citoplazmi. Pri optičnih meritvah vzorec krvi potuje v enakomernem toku skozi polje meritve, v katerega je usmerjen laserski žarek. Na površini celic pride do odboja in sipanja laserske svetlobe. Jakost sipane svetlobe (SCATTER) pod velikimi koti nam poda značilnosti notranje zgradbe celice, pod malimi koti pa velikost celice. S pomočjo ustrezne programske opreme pride do obdelave podatkov in do razvrstitve levkocitov na posamezne vrste.

Koncentracijo hemoglobina določi hematološki analizator fotometrično (merjenje absorbance pri 525 nm) s hemiglobincianidno metodo po hemolizi eritrocitov. Izmerjena absorbanca je direktno proporcionalna koncentraciji hemoglobina v vzorcu krvi.

Iz izmerjenih parametrov hematološki analizator izračuna naslednje parametre po sledečih formulah:

$$\text{VREDNOST HEMATOKRITA} = \text{št.konc.Erc.} \times \text{MCV}/10$$

$$\text{MCH} = \text{konc.HEMOGLOBINA} \times 10/\text{št.konc.Erc.}$$

$$\text{MCHC} = \text{konc. HEMOGLOBINA} \times 100/\text{vrednost HEMATOKRITA}$$

3.3.1.3. Delovni postopek

Analizirali smo vzorce venske krvi odvzete po zgoraj opisanem postopku v epruveto za zaprti odvzem krvi z dodatkom antikoagulantnega kalijeve soli EDTA (vijolični zamašek). Pred analizo smo s prostim očesom preverili ali vzorci vsebujejo makroskopsko vidne strdke ter jih nato premešali na valjčnem mešalcu 5 min. Analizo smo izvedli v času petih minut ali največ pol ure po odvzemu krvi na primarni način z avtomatskim podajalcem vzorcev. Zamašene premešane vzorce smo vložili v kasete in nato kasete vložili v za to namenjeno mesto v analizatorju. Temu je sledilo avtomatsko mešanje, aspiracija in nazadnje analiza vzorcev.

3.3.2. Mikroskopska diferencialna krvna slika

Hematološki analizatorji analizirajo poleg osnovnega hemograma tudi levkocitno diferencialno krvno sliko. Analizatorji prepoznajo in razvrstijo samo zrele, nespremenjene celice, vendar s posebnimi opozorili nakažejo morebitno prisotnost nezrelih ali morfološko

spremenjenih levkocitov. Mikroskopsko diferencialno krvno sliko smo opravili pri vseh bolnikih s sumom na infektivno mononukleozo. Pri vseh bolnikih je namreč analizator opozoril na nepravilnosti krvnih celic. Javil je »blasts« in »variant lymphs« zaradi katerega smo pripravili krvni razmaz za mikroskopsko diferencialno krvno sliko. Diferencialna krvna slika nam pokaže relativno in absolutno koncentracijo posameznih vrst levkocitov v krvi.

3.3.2.1. *Instrumenti in oprema*

- predmetno steklo
- razmazno steklo
- 2 kadički za barvanje s stojali za preparate
- merilna ura
- mikroskop

3.3.2.2. *Reagenti*

- Barvilo May-Grünwald, Fluka, 1 L, kat. št. 63590.

Barvilo je pripravljeno za uporabo in je hranjeno na sobni temperaturi, uporabno do datuma navedenega na embalaži.

- Barvilo Giemsa, Sigma, 100 mL, kat. št. 48900.

Za barvanje krvnih razmazov razredčimo barvilo s fosfatnim pufrom pH = 6,8; 10–11 mL barvila Giemsa dopolnimo do 300 mL s fosfatnim pufrom (razredčitev prilagodimo sprti potrebam vsake serije barvila in se odločimo po poskusnem barvanju).

- Fosfatni pufer pH = 6,8 (0,066 mol/L) pripravimo iz dinatrijevega hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) in kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4).

A raztopina Na_2HPO_4 94,50g Na_2HPO_4 (Kemika) raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

B raztopina KH_2PO_490,78g KH_2PO_4 (Kemika) raztopimo v 1000 mL destilirane vode.

Raztopini A in B hranimo v hladilniku.

Delovna raztopina fosfatnega pufra: 100mL raztopine A + 100 mL raztopine B dodamo 4000 mL destilirane vode. Korigiramo pH.

- Raztopina za čiščenje mikroskopa: 700 mL dietiletra, Fluka Chemicala, dodaj 300 mL etanola 96 %.
- Imerzijsko olje (Olympus), kat. št. N267320.

3.3.2.3. *Princip metode*

Za kvalitativno določanje posameznih vrst levkocitov moramo narediti kvaliteten krvni razmaz, ki ga pobarvamo po Pappenhemu z barvilom po May-Grünwaldu in razredčenim barvilom po Giemsi. Bazična barvila (azur, metilensko modrilo) obarvajo nukleinske kisline jedra in citoplazme, kislila barvila (eozin) pa citoplazemske beljakovine in hemoglobin. Za razredčevanje raztopine po Giemsi uporabljamo fosfatni pufer pH 6,8. Levkocite diferenciramo pod imerzijsko 1000 kratno povečavo, diferenciramo najmanj 100 levkocitov.

3.3.2.4. *Delovni postopek*

Priprava krvnega razmaza:

Za pripravo krvnega razmaza smo uporabili čisto, razmaščeno objektno steklo. Na njegov desni konec kanemo kapljico venske krvi. Predmetno steklo primemo s palcem in kazalcem leve roke. S palcem in kazalcem desne roke držimo razmazno steklo (iz posebej trdega stekla z ostro brušenim robom). Rob razmaznega stekla prislonimo pod kotom 30–40 ° tik pred krvno kapljico, zdrsimo z njim nekoliko desno, da se kri razleze ob celotnem robu, nato pa z enakomernim pritiskom na površino predmetnega stekla hitro potegnemo v levo, da dobimo tanek enakomeren sloj. Pri tem ne smemo spreminjati nagiba, hitrosti in jakosti pritiska razmaznega stekla na površino. Pravilno pripravljen krvni razmaz pokriva približno dve četrtini širine (v sredini) in tri četrtine dolžine predmetnega stekla. Ne sme biti stopničast, imeti mora ravne stranske robove in na koncu mora biti zaobljen. Na obrušeni rob s svinčnikom napišemo priimek in laboratorijsko številko. Pustimo da se krvni razmazi posušijo na zraku.

Barvanje krvnih razmazov:

Posušene krvne razmaze barvamo z mešanico v metanolu raztopljenih kislil in bazičnih barvil po May-Grünwald-Giemsi (MGG) s postopkom po Pappenheimu. V dveh kadičkih imamo: v prvi barvilo po May-Grünwaldu, v drugi s fosfatnim pufrom razredčeno barvilo po Giemsi. Objektna stekla s krvnimi razmazi zložimo v nosilec za preparate in ga

potopimo najprej za 5 min v May-Grünwaldovo raztopino, nato ga prestavimo v drugo kadičko in barvamo 15 min z razredčeno raztopino po Giemsi. Razmazi morajo biti med barvanjem popolnoma potopljeni v barvilo. Nazadnje razmaze dobro speremo s tekočo vodo in pustimo v pokončnem položaju, da se posušijo na zraku. V pravilno obarvanih razmazih so celična jedra vijoličasta, celična citoplazma je modra ali rožnata, nevtrofilne granulacije so sivovijoličaste, eozinofilne granulacije oranžne, bazofilne granulacije pa temno vijoličaste.

Diferenciranje celic v krvnem razmazu:

Mikroskopiramo tako, da s 400 kratno povečavo najprej poiščemo vidno polje in ocenimo kakovost razmaza. Na zaobljeni del razmaza kanemo kapljico imerzijskega olja in s 1000 kratno povečavo diferenciramo levkocite na njihove vrste. Diferenciramo na tankem delu razmaza, kjer so eritrociti enakomerno razporejeni drug poleg drugega in med njimi ni praznih otočkov ter se ne prekrivajo. Objektiv premikamo po tako imenovanem postopku »cik-cak« od zgoraj navzdol ali od spodaj navzgor. Pozornost posvetimo tudi morebitnim morfološkim spremembam v citoplazmi in jedru levkocitov ter jih opišemo. Ocenimo in opišemo še velikost, obarvanost in obliko eritrocitov ter trombocitov.

Izražanje rezultatov:

Ruzultat diferencialne krvne slike (števila posameznih vrst levkocitov) izražamo v relativnih (%) in absolutnih koncentracijah ($10^9/L$).



Slika 6: Mikroskop

3.3.3. Določanje biokemijskih parametrov v serumu

Določanje biokemijskih parametrov v serumu, to je določanje koncentracije celokupnega in direktnega bilirubina ter določanje katalitične aktivnosti jetrnih encimov (alkalne fosfataze, alanin-aminotransferaze, aspartat-aminotransferaze in gama-glutamil-transferaze), so izvedli v 24 – urnem laboratoriju z avtomatiziranim postopkom na biokemičnem analizatorju Advia 1800 po ustaljenem protokolu. Koncentracijo CRP v serumu pa so določili z avtomatiziranim postopkom na biokemičnem analizatorju Modular (Roche) prav tako po ustaljenem protokolu.

3.3.4. Hitri test na heterofilna protitelesa

Clearview IM (Unipath) je hitri imunološki kromatografski test za kvalitativno presejalno določanje heterofilnih protiteles, pretežno razreda IgM, ki nastanejo pri bolnikih z infekcijsko mononukleozo v serumu, plazmi ali polni krvi - EDTA, citratni, heparinski (venski ali kapilarni). Pri vseh bolnikih, ki so bili naročeni na preiskavo heterofilnih protiteles, smo isti dan iz polne venske krvi naredili hitri test. Pri bolnikih brez naročila smo opravili test naknadno iz seruma.

3.3.4.1. Reagenti, kalibratorji, kontrole

Reagentni komplet Clearview IM (Unipath), kataloška št.: 506815 (UNO6815) vsebuje:

- 20 pripravljenih testnih ploščic
- 2 mL raztopine R1 za redčenje (v kapilarni steklenički)

Reagenti so že pripravljeni za uporabo.

3.3.4.2. Instrumenti in oprema

- 20 plastičnih pipet za enkratno uporabo je priloženo v kompletu Clearview IM (Unipath)
- merilec časa



Slika 7: Reagenčni komplet Clearviw IM

3.3.4.3. Princip metode

Na membrano testne ploščice so pritrjeni glikoproteini govejih eritrocitov. Na območju ocenitve rezultata so glikoproteini govejih eritrocitov pritrjeni na modro obarvane delce lateksa. V vzorcu prisotna heterofilna protitelesa proti virusu infekcijske mononukleoze reagirajo z glikoproteini govejih eritrocitov in na področju ocenitve rezultata povzročijo nastanek modro obarvanega kompleksa, ki ga vidimo kot modro črto.

3.3.4.4. Podajanje rezultatov:

Rezultat izrazimo z 0 (negativno) ali 1 (pozitivno).

Pojav modre navpične črte v testnem okencu (T), tudi če je blede, skupaj z navpično modro v kontrolnem okencu (C) pomeni pozitiven rezultat. Prisotnost samo navpične modre črte v kontrolnem okencu (C) pomeni negativen rezultat. Rezultat testa je neveljaven, če se v kontrolnem okencu (C) ne pojavi navpična modra črta ali če se modra črta pojavi le v območju T.

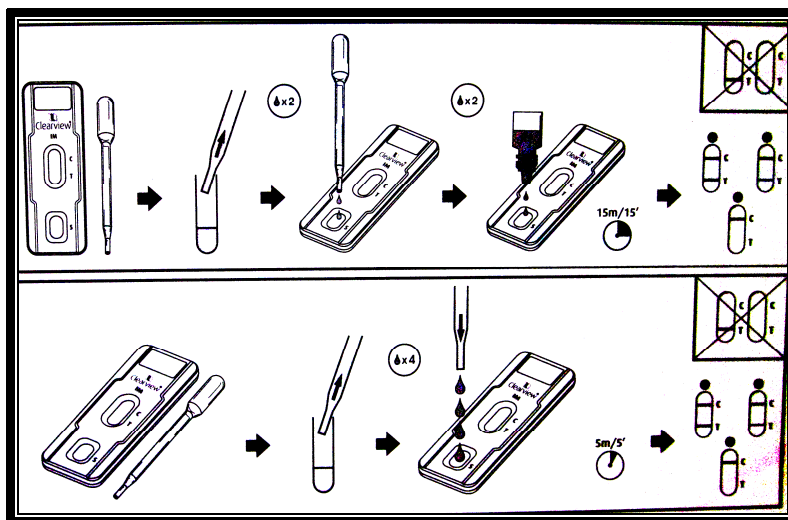
3.3.4.5. Validacija in zagotavljanje kakovosti

Proizvajalec navaja 95,5 % občutljivost in 100 % specifičnost za vzorce polne krvi ter 98,5 % občutljivost in 100 % specifičnost za vzorce plazme ali seruma v primerjavi s specifičnimi testi za dokaz okužbe z EBV.

3.3.4.6. Delovni postopek

Testno ploščico smo vzeli iz zaščitnega ovoja in jo položili na ravno površino. V vzorčno okence testne ploščice smo s priloženo plastično pipeto prenesli 2 kaplji polne krvi oziroma 4 kaplje seruma ali plazme. K vzorcu polne krvi smo takoj v vzorčno okence

kanili 2 kaplji reagenta R1. Rezultat analize vzorca polne krvi smo odčitali po 15 minutah, rezultat analize v serumu ali plazmi pa po 5 minutah.



Slika 8: Prikaz delovnega postopka izvajanja testa Clearview IM

3.3.5. Serološki testi

3.3.5.1. Dokazovanje specifičnih protiteles

Diagnostični sistem Vidas® je avtomatiziran test, ki se lahko izvaja na vseh Vidas instrumentih. Test je namenjen kvantitativnemu določanju specifičnih imunoglobulinov proti EBV v človeškem serumu. V našem primeru smo določali EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBV EBNA IgG protitelesa. Test smo izvajali v dveh serijah.

3.3.5.1.1. EBV VCA IgM

3.3.5.1.1.1. Namen in področje uporabe

Kvantitativen test je namenjen za določanje IgM protiteles proti virusnem kapsidnem antigenu (VCA). Prisotnost anti-VCA IgM protiteles kaže na primarno okužbo z EBV. Dokažemo jih v začetni fazi bolezni. Protitelesa anti-VCA IgM so običajno prisotna nekaj tednov po okužbi, nato pa izginejo.

3.3.5.1.1.2. Reagenti, kalibratorji, kontrole

Reagenčni komplet VIDAS anti-EBV VCA IgM, Bio Mérieux (katalogska številka: 30 237) vsebuje:

Preglednica III: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBV VCA IgM

30 EBV VCA IgM stripov	STR	stripi z reagenti za takojšnjo uporabo
30 EBV VCA IgM steklenih nastavkov SPR-jev	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR je obdana z monoklonskimi anti-humanimi IgM protitelesi
EBV VCA IgM pozitivna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti-VCA IgM v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50g/L + konzervansi
EBV VCA IgM standard 1 × 1,6 mL (raztopine)	S1	človeški serum z anti-VCA IgM v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje

Preglednica IV: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + Tween 20 0,05 % pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (300 µL)
3-4-5-7-8	Pufer za spiranje: TRIS pufer + Tween 20 0,25 % pH 7,8 + konzervansi (600 µL)
6	konjugat: VCA P18 antigen označen z alkalno fosfatazo in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400 µL)
9	raztopina za razredčitev vzorca: fosfatni pufer + polisorbitat 20 0,25% pH 7,2 + 5g/l BSA + konzervansi (400 µL)
10	Kiveta za končno detekcijo s substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/L) + dietanolamin (0,62 mol/L ali 6,6 %, pH 9,2) + 1g/L natrijev azid (300 µL)

3.3.5.1.2. EBV VCA/EA IgG

3.3.5.1.2.1. Namen in področje uporabe

Test je namenjen kvantitativnemu določanju IgG protiteles proti virusnem kapsidnem antigenu (VCA) in zgodnjem virusnem antigenu (EA). Protitelesa anti-VCA IgG se pojavijo v akutni fazi bolezni takoj za anti-VCA IgM protitelesi in ostanejo v organizmu vse življenje. V času porasta protiteles IgG proti VCA pa se pojavijo tudi protitelesa proti EA, ki kmalu izginejo iz krvi. Tako nam prisotnost EBV VCA/EA IgG kaže na akutno okužbo z EBV.

3.3.5.1.2.2. Reagenti, kalibratorji, kontrole

Reagenčni komplet VIDAS anti-EBV VCA/EA IgG, Bio Mérieux (kataloška številka: 30 236) vsebuje:

Preglednica V: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBV VCA/EA IgG

30 EBV VCA/EA IgG stripov	STR	stripi z reagenti za takojšnjo uporabo
30 EBV VCA/EA IgG steklenih nastavkov SPR-jev	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR obdana z VCA P18 in EA P54 protitelesi
EBV VCA/EA IgG pozitivna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti-VCA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50 g/L + konzervansi
EBV VCA/EA IgG standard 1 × 1,6 mL (raztopine)	S1	človeški serum z anti-VCA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje

Preglednica VI: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + Tween 20 0,05 % pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (600 µL)
3-4-5-7-8	spiralni pufer: fosfatni pufer + Tween 20 0,25 % pH 7,8 + 5g/l BSA + konzervansi (600 µL)
6	konjugat: z alkalno fosfatazo označena mišja monoklonska anti-človeška IgG protitelesa in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400 µL)
9	raztopina za razredčitev vzorca: fosfatni pufer + Tween 20 0,05 % pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (400 µL)
10	Kiveta za končno detekcijo s substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/L) + dietanolamin (0,62 mol/L ali 6,6 %, pH 9,2) + 1 g/L natrijev azid (300 µL)

3.3.5.1.3. EBV EBNA IgG

3.3.5.1.3.1. Namen in področje uporabe

Test je namenjen za kvantitativno detekcijo protiteles proti jedrnemu antigenu virusa Epstein-Barr (ang. Epstein-Barr nuclear antigen- EBNA). Protitelesa IgG proti EBNA

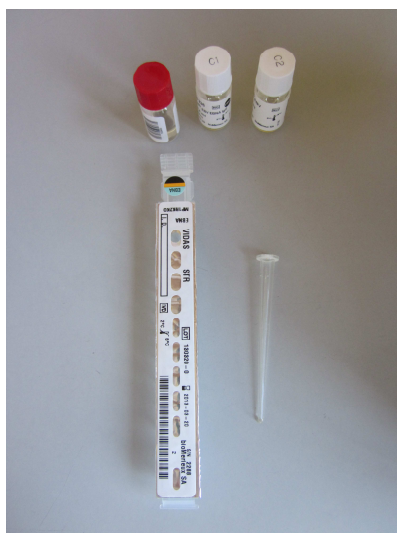
narastejo nekaj tednov po akutni okužbi, v dobi okrevanja. V krvi ostanejo v manjši meri prisotna vse življenje. Anti-EBNA IgG protitelesa v serumu nakazujejo preteklo okužbo z EBV.

3.3.5.1.3.2. Reagenti, kalibratorji, kontrole

Reagenčni komplet VIDAS anti-EBV EBNA IgG, Bio Mérieux (kataloška številka: 30 235) vsebuje:

Preglednica VII: Vsebnost diagnostičnega kompleta za kvantitativno določanje anti-EBNA IgG

30 EBV EBNA IgG stripov	STR	stripi z reagenti za takojšnjo uporabo
30 EBV EBNA IgG steklenih nastavkov SPR-jev	SPR	za takojšnjo uporabo, notranjost SPR obdana z EBNA-1 P72 antigenom
EBV EBNA IgG pozitivna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 1	človeški serum z anti- EBNA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
EBV negativna kontrola 1 × 0,6 mL (raztopine)	C 2	fosfatni pufer pH 7,4 + BSA 50 g/L + konzervansi
EBV EBNA IgG standard 1 × 1,6 mL (raztopine)	S1	človeški serum z anti- EBNA IgG v fosfatnem pufru pH 7,4 + 50 g/L BSA + konzervansi
1 MLE kartica (kartica z umeritveno krivuljo)		karton s podatki za kalibracijo z uporabo umeritvene krivulje



Slika 9: Reagenčni komplet za določanje anti-EBNA IgG

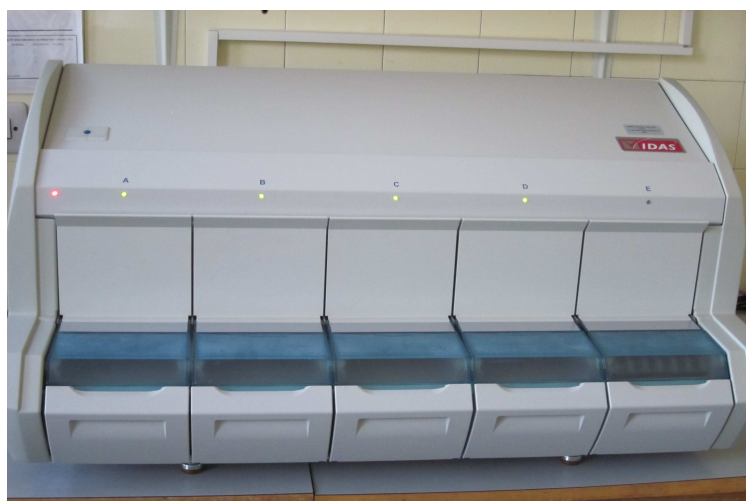
Preglednica VII: Opis vsebine reagenčnih posodic za VCA IgM

prostorčki	reagenti
1	prostor za vzorec
2	razredčitvena raztopina: fosfatni pufer + Tween 20 0,05 % pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (600 µL)
3-4-5-7-8	spiralni pufer: TRIS pufer + Tween 20 0,25 % pH 7,8 + 5 g/L BSA + konzervansi (600 µL)
6	konjugat: z alkalno fosfatazo označena mišja monoklonska anti-človeška IgG protitelesa in fosfatni pufer pH 6,1 + proteinski stabilizatorji + konzervansi (400 µL)
9	raztopina za razredčitev vzorca: fosfatni pufer + Tween 20 0,05 % pH 7,2 + 5 g/L BSA + konzervansi (400 µL)
10	Kiveta za končno detekcijo s substratom: 4-metil-umbeliferil fosfat (0,6 mmol/L) + dietanolamin (0,62 mol/L ali 6,6 %, pH 9,2) + 1 g/L natrijev azid (300 µL)

Reagenti za izvedbo vseh treh (EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG) testov so že pripravljeni za uporabo v reagentnem traku. Prav tako analizator avtomatsko izvede vse navedene korake metode. Delovni postopek, princip metode, instrumenti in oprema je enako za vse tri teste in je opisano v nadaljevanju.

3.3.4.2.4. Instrumenti in oprema

Za izvedbo testa smo potrebovali analizator VIDAS® (Bio Mérieux) (slika 10) in že pripravljene reagenčne komplete za določanje posamezne vrste protiteles. Za natančno odmerjanje volumna vzorcev smo uporabili pipeto Biohit ter 100 µL nastavke za pipetiranje. Roke smo zaščitili z rokavicami.



Slika 10: Analizator VIDAS

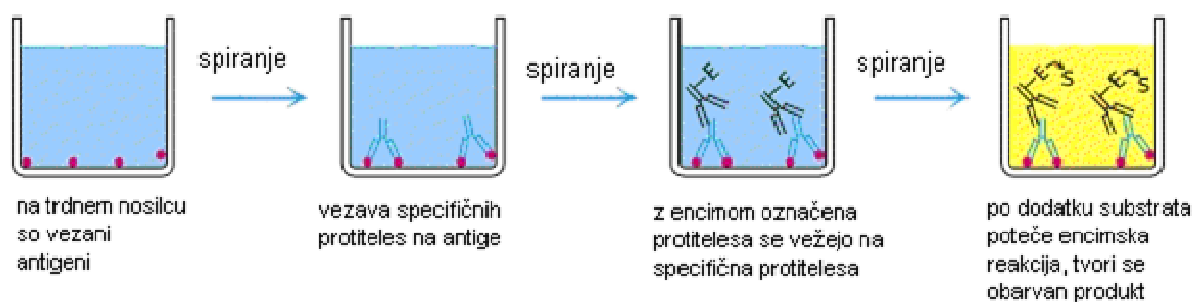
3.3.5.1.5. Princip metode

Testi anti-EBV VCA IgM, anti-EBV VCA/EA IgG in anti-EBNA IgG temeljijo na dvostopenjski encimsko-imunski metodi s fluorescenčno detekcijo (ELFA- Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Anti-EBV VCA IgM protitelesa iz vzorca se v prvem koraku vežejo z mišjimi monoklonskimi protitelesi na steklenem trdnem nosilcu (Solid Phase Receptacle-SPR®) in z njimi tvorijo imunski kompleks. V naslednjem koraku dodamo VCA P18 antigen konjugiran z alkalno fosfatazo. Antigen se specifično veže na anti-EBV VCA IgM protitelesa.

Anti-EBV VCA/EA IgG protitelesa iz vzorca se v prvem koraku vežejo z VCA P18 in EA P54 antigeni, ki obdajajo steklen trden nosilec (Solid Phase Receptacle-SPR®). Nevezane snovi se odstranijo med spiranjem. V naslednjem koraku dodamo mišja monoklonska protitelesa proti človeškim IgG (IgG v obliki Fab') konjugirana z alkalno fosfatazo. Ta se vežejo na protitelesa iz vzorca, ki so pritrjena na antigen, vezan na SPR.

Anti-EBNA IgG protitelesa iz vzorca se v prvem koraku vežejo z EBNA P72 antigenom, ki obdaja notranjost steklenega trdnega nosilca (Solid Phase Receptacle-SPR®). Nevezane snovi se odstranijo med spiranjem. V naslednjem koraku dodamo mišja monoklonska protitelesa proti človeškim IgG (IgG v obliki Fab') konjugirana z alkalno fosfatazo. Ta se vežejo na protitelesa iz vzorca, ki so pritrjena na antigen, vezan na SPR.



Slika 11: Princip indirektne ELISA metode [50]

Zadnja faza je pri vseh treh testih enaka. Alkalna fosfataza hidrolizira dodan substrat (4-metil-umbeliferil fosfat) v fluorescenčni produkt (4-metil-umbeliferon). Fluorescenco merimo pri 450 nm. Intenzivnost fluorescence je premo sorazmerna s koncentracijo protiteles v serumu.

3.3.5.1.6. Delovni postopek

Vzorci seruma, ki so bili shranjeni v zamrzovalniku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo najmanj 30 min pred analizo postavili na sobno temperaturo in jih tako odmrznili. Tudi vse tri diagnostične komplete smo pred analizo vzeli iz hladilnika (hranjeni so na $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$) in jih pustili stati na sobni temperaturi najmanj 30 min. Analize določanja EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG protiteles smo obravnavali kot samostojne analize, kljub temu da je delovni postopek za vse tri enak.

Na začetku smo v analizatorju izbrali katero analizo oz. katera protitelesa bomo določali (EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG protitelesa). Za vsak vzorec, standard in obe kontroli smo uporabili svojo reagenčno posodico in pripadajoč SPR nastavek.

Pred pipetiranjem smo standard, obe kontroli in vzorce dobro premešali. V vzorčne odprtine na reagenčni posodici smo odpipetirali $100\text{ }\mu\text{L}$ standarda, pozitivno C1 in negativno C2 kontrolo ter vzorce. Reagenčne posodice in pripadajoče SPR nastavke smo vstavili v VIDAS analizator. V računalnik analizatorja smo vnesli podatke in določili pozicije vseh vzorcev tako kot smo jih vstavili v analizator. Analiza se je pričela s klikom na gum Start. Najprej smo testirali standard S1 v trojniku ter pozitivno in negativno kontrolo, šele nato vzorce. Vsi koraki analize so bili izvedeni avtomatično. Rezultate smo dobili v nekaj urah izpisane na računalniku. Po končani analizi smo iz analizatorja odstranili SPR-je in reagenčne posodice, ki smo jih zavrgli v koš z biološkimi odpadki.

3.3.5.1.7. Podajanje rezultatov

Rezultati, ki se izpišejo na računalniku so v RFV (ang.: realtive fluorescence value) enotah. Za vsak vzorec se meri fluorescenca v reagenčni kiveti dvakrat. Najprej se izmeri fluorescenca pred dodatkom substrata (ozadje) in nato po dodatku substrata, ki zreagira z encimom in dobimo fluorescenčni produkt. Od končne izmerjene vrednosti se odšteje vrednost ozadja in tako dobimo rezultat v RFV za naš analit. Sistem VIDAS za interpretacijo rezultatov podaja testne vrednosti TV (ang.: test value), ki se izračuna po sledeči formuli:

Testna vrednost (TV) = vrednost RFV vzorca / povprečna vrednost RFV standarda

Glede na testno vrednost vzorcev, se rezultate analize različno interpretira. Interpretacija rezultatov je opisana v Preglednici IX in Preglednici X.

Preglednica IX: Interpretacija rezultatov analize encimsko fluorescenčnega imunskega testa VIDAS EBV VCA IgM

Testna vrednost (TV)	Interpretacija
$\leq 0,11$	Negativna vrednost
$0,12 \leq TV \leq 0,18$	Mejna vrednost
$\geq 0,19$	Pozitivna vrednost

Preglednica X: Interpretacija rezultatov analize encimsko fluorescenčnega imunskega testa VIDAS EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG

Testna vrednost (TV)	Interpretacija
$\leq 0,09$	Negativna vrednost
$0,10 \leq TV \leq 0,20$	Mejna vrednost
$\geq 0,21$	Pozitivna vrednost

3.3.5.1.8. Vrednotenje rezultatov

Diagnoza IM in določitev v kateri fazi okužbe je bolnik lahko opredelimo na podlagi rezultatov vseh treh VIDAS testov. Za vsako obdobje virusne okužbe so značilna specifična protitelesa proti določenim virusnim antigenom. Na podlagi tega lahko sklepamo v kateri fazi okužbe je bolnik. Podatki so podani v Preglednici XI.

Preglednica XI: Faza okužbe z EBV glede na rezultat vseh treh VIDAS testov – EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG

VIDAS EBV TESTI			
VCA IgM	VCA/EA IgG	EBNA IgG	STATUS OKUŽBE
–	–	–	odsotnost specifičnih protiteles, ni infekcije
+	–	–	zgodnja faza IM, primarna infekcija ²
+	+	–	akutna okužba
–	+	+ ¹	pretekla okužba
–	–	+	izolirani EBNA IgG ²
–	+	–	izolirani VCA/EA IgG ²
+	+	+	nedoločljiv profil okužbe ²

LEGENDA: – : odsotnost protiteles, negativen rezultat

+ : prisotnost protiteles, pozitiven rezultat

¹ : v redkih primerih protitelesa proti EBNA niso detektirana pri bolnikih s preteklo okužbo

² : potrebno ponovno testirati bolnika 1 do 2 tedna pozneje

3.4. STATISTIČNE METODE

Podatke smo statistično obdelali s pomočjo statističnih programov Microsoft Exel in SPSS (ang. Statistical Package for the Social Sciences). Vsak posamezen marker smo najprej ovrednotili z deskriptivno ali opisno statistiko. Računali smo aritmetično sredino ($\bar{x}$), standardno deviacijo (SD), mediano, minimum in maximum (razpon), koeficient sploščenosti ter koeficient simetrije. Razpršenost podatkov smo prikazali s pomočjo grafov. Testirali smo porazdelitev podatkov ter se na podlagi pridobljenih rezultatov odločili za nadaljno statistično obravnavo. Z različnimi statističnimi testi smo testirali hipoteze in na koncu povzeli zaključke.

3.4.1. Statistični testi

Pri izračunu statističnih parametrov smo si pomagali s programom SPSS 17.0.

3.4.1.1. Testiranje normalnosti porazdelitve

Pri izboru ustrezne metode je pomemben pogoj normalna porazdelitev vrednosti proučevane spremenljivke. To smo preverili z One Sample Kolmogorov-Smirnovim testom.

- KOLMOGOROV-SMIRNOV TEST – je neparametričen test, ki se uporablja v primeru zveznih spremenljivk pri velikih vzorcih. Test primerja vrednosti proučevane spremenljivke z vrednostmi normalno porazdeljene spremenljivke z enako aritmetično sredino in standardnim odklonom, kot ga ima proučevana spremenljivka. Slabost testa je ta, da ima pri majhnih vzorcih nizko moč [55].

Rezultate smo vrednotili s p vrednostjo in sicer $p > 0.05$, kar predstavlja 95 % verjetnost. Glede na rezultate normalnosti porazdelitve smo se odločali za različne neparametrične teste za ugotavljanje korelacij med izbranimi spremenljivkami.

3.4.1.2. Neparametrični testi

Neparametrične teste uporabljamo za ugotavljanje razlik med povprečnimi vrednostmi neodvisnih vzorcev za opisne spremenljivke, ki jih merimo na ordinalni skali ali za številske spremenljivke, katerih vrednosti niso normalno porazdeljene [54]. Značilnost neparametričnih testov je ta, da so bistveno manj občutljivi kot parametrični testi, vendar je njihova uporabnost širša zaradi manj strogih predpostavk. Poslužujemo se jih pri manj

zahtevnih analizah, njihova prednost pa je tudi v tem, da so uporabni za vse vrste podatkov (kvantitativne in atributivne).

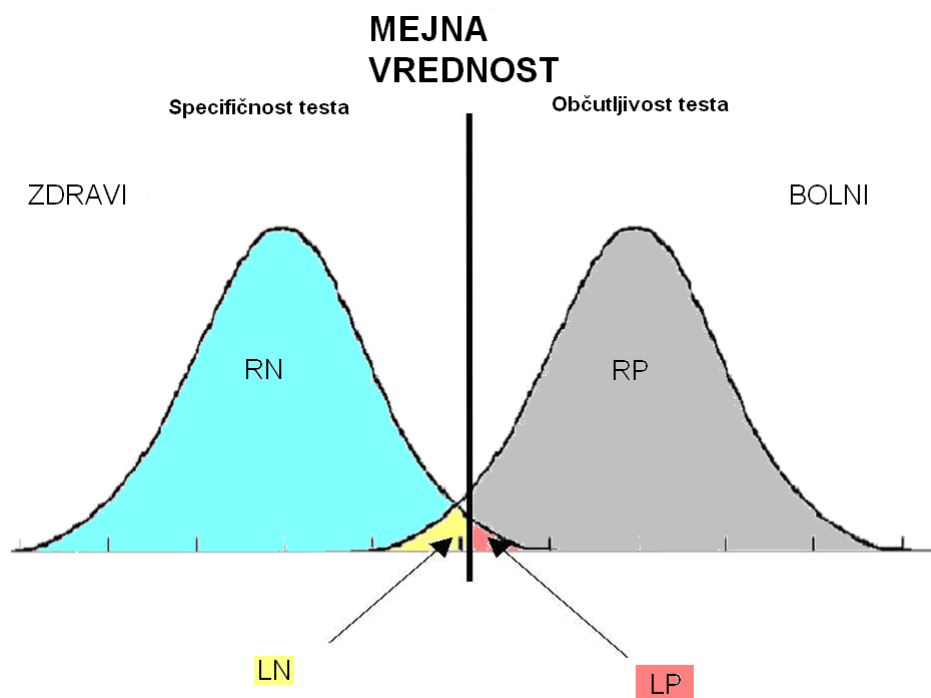
- MANN-WHITNEYEV TEST – je neparametričen analog parametričnemu t – testu. Uporablja se za ugotavljanje značilnih razlik med dvema povprečnima vrednostma za neodvisna vzorca. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov [55, 56].
- FISHERJEV EKSAKTNI TEST – se uporablja pri testiranju atributivnih podatkov pri manjšem številu vzorcev. Temelji na izračunu razlike pridobljenih frekvenc glede na pričakovane.
- SPEARMANOV KOEFICIENT KORELACIJE RANGOV – je neparametrični analog Paersanovega koeficienta korelacije. Prikaže neparametrično stopnjo povezanosti med spremenljivkami. Podatke je potrebno preoblikovati v range. Za določanje Spearmanovega koeficienta korelacije je pomembna razlika med rangi določene vrednosti.

3.4.2. Občutljivost in specifičnost

Vse laboratorijske teste s katerimi diagnosticiramo infekcijsko mononukleozo smo ovrednotili z izračunom njihove občutljivosti in specifičnosti:

OBČUTLJIVOST testa izrazimo z razmerjem števila oseb s pozitivnim rezultatom testa glede na število vseh oseb, ki so resnično bolne. Resnično bolni ljudje predstavljajo paciente, ki imajo resnično pozitiven (RP) in lažno negativen (LN) rezultat testa [54–56]. Občutljivost testa nam pove, kako pogosto je test pozitiven pri bolnikih [30].

SPECIFIČNOST testa izrazimo z razmerjem števila oseb z negativnim rezultatom testa glede na število vseh oseb, ki so resnično brez bolezni. Resnično zdravi ljudje so tisti, ki imajo resnično negativen (RN) in lažno pozitiven (LP) rezultat testa [54–56]. Specifičnost testa nam pove, kako pogosto je test negativen pri zdravih preiskovancih [30].



Graf 1: Prikaz mejne vrednosti, specifičnosti in občutljivosti testa (RN – resnično negativni; LN – lažno negativni; LP – lažno pozitivni; RP – resnično pozitivni).

Specifičnost in občutljivost testa lahko spreminjamo s premikom razmejitvene vrednosti za pozitiven rezultat. Pri tem pa moramo biti previdni, saj z večanjem specifičnosti zmanjšujemo občutljivost in obratno [33].

Testi z visoko občutljivostjo so uporabni za odkrivanje bolezni, saj je število lažno negativnih rezultatov minimalno. Pri tem pa pričakujemo, da bo test velikokrat pozitiven tudi pri osebah, ki nimajo bolezni [33].

Testi z visoko specifičnostjo so uporabni za potrditev določenega obolenja in dajejo minimalno število lažno pozitivnih rezultatov. Uporabljajo se kot potrditveni diagnostični testi [33].

4. REZULTATI

4.1. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN VREDNOTENJE PREISKOVANE SKUPINE

Na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja so bili napoteni bolniki, ki so imeli simptome povezane z neko okužbo. Po pregledu zdravnika in osnovnih laboratorijskih preiskavah (vsem smo opravili osnovne hematološke preiskave z diferencialno krvno sliko ter mikroskopsko diferencialno krvno sliko, izmerjeni so jim bili biokemični markerji v 24 – urnem laboratoriju in opravili smo hitri test na heterofilna protitelesa) smo v obdobju marec 2011 – julij 2012 vključili v raziskavo 40 bolnikov s sumom na primarno okužbo z EBV. Med njimi je bilo 21 bolnic in 19 bolnikov, starih od 2 do 53 let. Povprečna starost preiskovancev v skupini je bila 16 let. Vsem preiskovancem smo dodatno izvedli specifične serološke teste, s katerimi smo nekaterim diagnosticirali infekcijsko mononukleozo, drugim ne.

Najprej smo ovrednotili celotno preiskovano skupino z izračunom deskriptivnih (opisnih) statistik za izbrane markerje, ki so pomembni pri diagnostiki infekcijske mononukleoze. Iz preglednice XII lahko razberemo glavne statistične značilnosti posameznih parametrov (spremenljivk), in sicer: povprečno vrednost (mean), standardno deviacijo, mediano, najnižjo (minimum) in najvišjo (maximum) vrednost ter koeficienta sploščenosti in asimetričnosti.

Preglednica XII: Rezultati deskriptivne statistike posameznih parametrov

	Št.	Povp. vrednost	Stand. deviacija	Mediana	Minimum	Maksimum	Koeficient sploščenosti	Koeficient asimetričnosti
Št. konc. levkocitov $10^9/L$	40	13,14	5,5566	11,8	5,6	31,6	2,397	1,436
Št. konc. limfocitov $10^9/L$	40	4,628	2,9361	3,65	1,3	13,3	1,685	1,493
Limfociti %	40	34,75	12,6263	33,5	12	65	-0,166	0,352
Št. konc. monocitov $10^9/L$	40	0,8075	0,58677	0,7	0,1	2,6	2,242	1,506
Monociti %	40	6,35	3,4235	6	1	13	-1,119	0,129
Št. konc. eozinofilcev $10^9/L$	40	0,12	0,1814	0	0	0,8	4,909	2,099

Eozinofilci %	40	0,975	1,5273	0	0	7	6,127	2,317
Št. konc. bazofilcev 10 ⁹ /L	40	0,028	0,0554	0	0	0,2	3,042	1,949
Bazofilci %	40	0,25	0,4935	0	0	2	2,819	1,852
Št. konc. nevtrofilcev 10 ⁹ /L	40	3,735	1,6195	3,5	1,1	7,8	-0,39	0,491
Nevtrofilci %	40	30,55	11,7712	29,5	5	54	-0,431	0,149
Št. konc. atipičnih limfocitov 10 ⁹ /L	40	3,58	2,4145	3,05	0,9	11	2,424	1,514
Atipični limfociti %	40	25,55	8,8548	26	13	54	1,169	0,809
Št. konc. plazma celic 10 ⁹ /L	40	0,195	0,398	0,1	0	2,3	20,662	4,214
Plazma celice%	40	1,575	2,7725	1	0	14	11,286	3,225
CEL.BILIRUBIN (μmol/L)	40	14,87	14,3819	10	3,8	71	7,023	2,577
DIR.BILIRUBIN (μmol/L)	40	8,318	11,7873	4	1,7	60	11,178	3,241
AP (μkat/L)	40	3,7475	2,62342	2,835	1,26	12,85	3,486	1,773
AST (μkat/L)	40	2,3823	2,5921	1,49	0,33	14,06	9,997	2,798
ALT (μkat/L)	40	3,2945	3,44203	1,83	0,37	14,91	3,435	1,861
y-GT (μkat/L)	40	1,9905	2,05764	1,355	0,17	9,26	3,305	1,767

Že iz samih povprečnih vrednostih je razvidno, da so nekateri parametri (številčna koncentracija levkocitov, limfocitov in atipičnih limfocitov) značilno večji od zgornje referenčne vrednosti (referenčne vrednosti za vsak parameter so navedene v Prilogah 2, 3, 4 in 5).

Glede na referenčne zgornje in spodnje mejne vrednosti, ki so predpisane za zdravega človega, smo za vsak posamezen parameter izračunali koliko preiskovancev je imelo določeno vrednost povišano, znižano ali normalno.

Osnovne hematološke preiskave so pri večini preiskovancev pokazale značilno levkocitno krvno sliko za infekcijsko mononukleozo. Povprečna številčna koncentracija levkocitov pri preiskovani skupini bolnikov je bila $13,1 \times 10^9/L$, med njimi je bilo 75 % (30/40) preiskovancev s povečanim številom levkocitov v krvi in 25 % (10/40) bolnikov z normalno vrednostjo števila levkocitov v krvi. Analizator je pri vseh preiskovancih javil atipične in različne oblike limfocitov. 75 % (30/40) bolnikov je imelo povečano absolutno in relativno število vseh limfocitov (normalnih in atipičnih limfocitov), pri 25 % (10/40) bolnikov je vrednost znotraj referenčnih, normalnih vrednosti. Povprečno absolutna koncentracija atipičnih limfocitov v krvi med preiskovanci je bila $3,6 \times 10^9/L$, to je 43,9 % od vseh limfocitov. Pri 62,5 % (25/40) bolnikov so bile v krvi prisotne plazmatke, katerih povprečna absolutna koncentracija je bila $0,2 \times 10^9/L$ ter povprečno relativno število 1,6

%. Absolutna koncentracija monocitov je bila povečana pri 25 % bolnikov (10/40), relativna koncentracija pa pri 15 % (6/40). Relativno koncentracijo nevtrofilcev ima 90 % (36/40) bolnikov znotraj referenčnih, normalnih vrednosti, 3 bolniki imajo rahlo zmanjšano, 1 bolnik pa rahlo povečano relativno koncentracijo nevtrofilcev. Zaradi celokupno povečane številčne koncentracije levkocitov, ima kar 77,5 % (31/40) bolnikov zmanjšano absolutno koncentracijo nevtrofilcev na račun povečanega števila limfocitov. Absolutno in relativno število eozinofilcev in bazofilcev je pri vseh bolnikih znotraj normalnih vrednosti, z razliko enega pacienta, ki ima rahlo povišano absolutno in relativno število eozinofilcev.

Biokemični parametri, ki so jih določali v serumu so: koncentracija celokupnega in direktnega bilirubina, aktivnosti jetrnih encimov (AP, ALT, AST, GGT) ter koncentracija CRP. Povprečna koncentracija celokupnega bilirubina v serumu preiskovane skupine je znašala 14,9 $\mu\text{mol/L}$. Samo 20 % (8/40) bolnikov je imelo povečano koncentracijo celokupnega bilirubina, ostali so imeli koncentracijo znotraj orientacijskih referenčnih vrednosti. Za direktni bilirubin smo izračunali povprečno koncentracijo, ki je 8,3 $\mu\text{mol/L}$. Od tega je imelo povečano koncentracijo nekoliko več bolnikov, to je 32,5 % (13/40), ostali so imeli koncentracijo direktnega bilirubina do 5 $\mu\text{mol/L}$, kar je znotraj orientacijskih referenčnih vrednosti. Povečano aktivnost AP smo določili pri 70 % (28/40) bolnikov, v povprečju je vrednost aktivnosti AP 3,75 $\mu\text{kat/L}$, kar je višje od referenčnih vrednosti tako za moške kot za ženske. Le 10 % (4/40) bolnikov je imelo normalno aktivnost AST, vrednosti vseh ostalih 90 % (36/40) bolnikov so bile povečane. Prav tako je večina bolnikov, 87,5 % (35/40), imela povečano aktivnost ALT in le 12,5 % (5/40) normalno. Aktivnost GGT je bila povečana pri 62,5 % (25/40) bolnikov, ostali 37,5 % (15/40) so imeli vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Le 10 % (4/40) bolnikov je imelo koncentracijo CRP pod 5 mg/L, ki velja za referenčno mejo. Pri 90 % (36/40) bolnikov je bila koncentracija CRP povečana. Glede na mejo 40 mg/L, ki ločuje virusno okužbo od bakterijske [39], pa je 67,5 % (27/40) bolnikov takih, ki so imeli koncentracijo CRP manjšo od 40 mg/L, ostali bolniki so imeli večjo koncentracijo CRP.

Vse vrednosti izbranih parametrov smo predstavili tudi grafično, in sicer s kvartilnim diagramom (ang. Box plot). Iz take grafične predstavitve je razvidno v kakšnem razponu oziroma kako se porazdeljujejo podatki v preiskovani skupini. Poleg tega pa lahko iz diagramov razberemo ali je v skupini prisotna »osamela« vrednost, ki izstopa. V grafični predstavitvi *Box plot* osrednja odebeljena črta označuje mediano, robovi okvirja označujejo

spodnji in zgornji kvartil (Q1 in Q4), ročaj okvirja pa predstavljajo najnižjo in najvišjo ekstremno vrednost. Katerakoli vrednost, ki je višja oziroma nižja od ročajev okvirja predstavlja osamelo vrednost ali osamelec.

Od vseh predstavljenih grafov (grafi so predstavljeni v Prilogi 6) le številčna in relativna koncentracija nevtrofilcev, ter relativna koncentracija atipičnih limfocitov v krvi ne vsebujejo osamele vrednosti, pri vseh ostalih parametrih pa jih je prisotnih kar nekaj. Zaradi tako visoke razpršenosti podatkov, tako majhnega števila preiskovancev v skupini in glede na vrednosti koeficientov sploščenosti in asimetričnosti ter kasneje predstavljenega testa normalnosti porazdelitve smo se odločili, da bomo kljub velikemu številu osamelcev pri posameznih parametrih, upoštevali vse pridobljene številčne vrednosti. Glede na nenormalne porazdelitve podatkov pri vseh parametrih pa smo se poslužili neparametričnih testov za statistično testiranje različnih hipotez.

Vsem bolnikom smo izvedli hitri test na heterofilna protitelesa, ki nam poda kvalitativno oceno prisotnosti oziroma odsotnosti heterofilnih protiteles razreda IgM. Pri 14-ih (35 %) bolnikih s sumom na akutno okužbo z EBV je bil test negativen, kar pomeni, da pri teh bolnikih nismo našli dovolj velike količine heterofilnih protiteles, ki bi jih test zaznal. Ostalih 65 % (26/40) preiskovanih je bilo pozitivnih. Rezultati hitrega testa so predstavljeni v spodnji tabeli (Preglednica XIII).

Vsem bolnikom v preiskovani skupini smo opravili še specifične serološke teste. V serumu smo kvantitativno določili prisotnost specifičnih protiteles proti virusnim antigenom, ki so: anti-VCA IgM, anti-VCA/EA IgG in anti EBNA IgG. Rezultate testa smo vrednotili s pozitivno, negativno in mejno vrednostjo. Rezultati so predstavljeni v spodnji tabeli (Preglednica XIII). Na podlagi rezultatov vseh treh testov, smo določili bolnikov status okužbe, ki je prav tako opisan v omenjeni tabeli. Izmed vseh preiskovancev je bilo 6 bolnikov (15 %) takih, ki so imeli test na anti-VCA IgM protitelesa negativen, le 1 bolnik je imel mejno vrednost, vsi ostali 82,5 % (33/40) pa so bili pozitivni. Pri analizi protiteles IgG proti VCA/EA je bilo prav tako 6 (15 %) bolnikov negativnih, 3 bolniki z mejnimi vrednostmi, ostalih 77,5 % (31/40) bolnikov pa je imelo pozitiven test. Test anti-EBNA IgG nam je pokazal 10 % (4/40) bolnikov s pozitivno vrednostjo testa, 1 bolnik je imel vrednost protiteles na meji, pri ostalih 72,5 % (29/40) bolnikih je bil test negativen.

Preglednica XII: Predstavitev rezultatov hitrega testa in seroloških testov ter njihova interpretacija

PACIENT	HITRI TEST	VCA IgM	VCA/EA IgG	EBNA IgG	INTERPRETACIJA REZULTATOV
1	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
2	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
3	POZ	POZ	NEG	NEG	zgodnja faza akutne IM
4	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
5	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
6	POZ	na meji	POZ	POZ	pretekla okužba
7	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
8	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
9	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
10	POZ	POZ	na meji	NEG	zgodnja faza akutne IM
11	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
12	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
13	POZ	POZ	na meji	NEG	zgodnja faza akutne IM
14	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
15	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
16	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
17	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
18	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
19	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
20	NEG	NEG	POZ	POZ	pretekla okužba
21	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
22	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
23	NEG	POZ	na meji	NEG	zgodnja faza akutne IM
24	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
25	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
26	NEG	NEG	POZ	POZ	pretekla okužba
27	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
28	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
29	NEG	NEG	NEG	na meji	pretekla okužba
30	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
31	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
32	NEG	NEG	NEG	NEG	NI EBV INFEKCIJE
33	POZ	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
34	NEG	NEG	NEG	NEG	NI EBV INFEKCIJE
35	POZ	POZ	POZ	POZ	pretekla okužba s ponovnim izbruhom
36	NEG	NEG	NEG	NEG	NI EBV INFEKCIJE
37	NEG	POZ	NEG	NEG	zgodnja faza akutne IM
38	POZ	POZ	poz	NEG	akutna IM/primarna infekcija
39	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija
40	NEG	POZ	POZ	NEG	akutna IM/primarna infekcija

Od vseh 40-ih bolnikov s sumom na EBV okužbo je imelo 12,5 % (5/40) bolnikov ugotovljeno zgodno fazo akutne IM. Pri teh bolnikih so bila v serumu prisotna le anti-VCA

IgM protitelesa. 67,5 % (27/40) bolnikov je imelo diagnosticirano primarno EBV infekcijo oziroma akutno IM, saj so imela v serumu prisotna protitelesa proti VCA IgM ter protitelesa proti VCA/EA IgG. Pri 10 % (4/40) bolnikov smo v serumu določili anti-EBNA IgG ter pri nekaterih tudi anti-VCA/EA IgG protitelesa, kar nam nakazuje preteklo okužbo. 1 bolnik je imel vse tri vrste določenih protiteles pozitivne. Pri tem bolniku nam protitelesni odziv nakazuje preteklo okužbo s ponovnim izbruhom. Trije bolniki so bili negativni na vse tri vrste določenih protiteles, kar je pokazatelj, da pri njih ni prišlo do infekcije z EBV.

Na podlagi specifične serološke diagnostike smo 33-im (82,5 %) preiskovancem potrdili bolezen IM in jim natančno opredelili stopnjo okužbe. 7-im (17,5 %) preiskovancem pa na podlagi serološke diagnostike nismo dokazali infekcijske mononukleoze, oziroma je bila bolezen prisotna v preteklosti.

4.2. TEST NORMALNOSTI PORAZDELITVE PODATKOV

S Kolmogorov-Smirnovim testom smo ugotavljali normalnost porazdelitve posameznih parametrov v preiskovani skupini. Pri testiranju smo ugotavljali statistično značilnost razlik med porazdelitvijo vrednosti parametrov in normalno porazdelitvijo. Ničelna hipoteza pravi, da ni signifikantne razlike med porazdelitvama in se parameter porazdeljuje normalno. Alternativna hipoteza pa temu nasprotuje. Pri testiranju smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha = 0.05$. Vrednost p je bila v vseh primerih manjša od α (preglednica XIV). Ničelno hipotezo smo zavrnile ter sprejeli alternativno hipotezo, ki pravi, da vrednosti parametrov niso normalno razporejene.

Preglednica XIV: Rezultati testov normalnosti porazdelitve parametrov

Test of Normality			
	Kolmogorov-Smirnova		
	Statistic	df	p
št.konc.levkocitov %	0,203	40	0,000
Limfociti $10^9/L$	0,258	40	0,000
Limfociti %	0,167	40	0,007
Monociti $10^9/L$	0,184	40	0,002
Monociti %	0,106	40	0,200
Eozinofilci $10^9/L$	0,271	40	0,000
Eozinofilci %	0,268	40	0,000
Bazofilci $10^9/L$	0,465	40	0,000

Bazofilci %	0,469	40	0,000
Nevtrofilci $10^9/L$	0,128	40	0,100
Nevtrofilci %	0,069	40	0,200
Atipični limfociti $10^9/L$	0,147	40	0,029
Atipični limfociti %	0,133	40	0,073
Plazma celice $10^9/L$	0,320	40	0,000
Plazma celice%	0,339	40	0,000
CEL.BILIRUBIN ($\mu\text{mol/L}$)	0,279	40	0,000
DIR.BILIRUBIN ($\mu\text{mol/L}$)	0,303	40	0,000
AP ($\mu\text{kat/L}$)	0,175	40	0,003
AST ($\mu\text{kat/L}$)	0,243	40	0,000
ALT ($\mu\text{kat/L}$)	0,199	40	0,000
γ -GT ($\mu\text{kat/L}$)	0,189	40	0,001
S-CRP (mg/L)	0,158	40	0,015

4.3. UGOTAVLJANJE RAZLIK PARAMETROV MED SKUPINO BOLNIKOV Z INFEKCIJSKO MONONUKLEOZO IN SKUPINO BOLNIKOV BREZ INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE

Poskušali smo ugotoviti ali se kaže statistično značilna razlika v katerem od parametrov med skupino bolnikov z infekcijsko mononukleozo in bolnikov brez nje. Zaradi nenormalnih porazdelitev numeričnih podatkov, smo uporabili Mann-Whitney-jev test, ki je neparametričen analog testu-t (55).

Pri izvedbi Mann – Whitney–jevega testa je potrebno številčne spremenljivke pretvoriti v range, tako da se najmanjši vrednosti pripiše rang 1, naslednji najmanjši rang 2 in tako naprej. Povprečni rang za posamezen vzorec izračunamo tako, da vsoto rangov delimo z velikostjo vzorca (N). Primerjamo povprečno vrednost rangov med obema skupinama. Zanima nas ali je razlika v povprečni vrednosti rangov s 5 % stopnjo tveganja statistično značilna ali ne. Ničelna hipoteza pravi, da vzorca prihajata iz iste populacije. Alternativna hipoteza temu nasprotuje. Pri vrednostih $p > 0,05$ zavržemo alternativno hipotezo in sprejmemo ničelno hipotezo (54)

Preglednica XV nam prikazuje rezultate Mann – Whitney–jevega testa. Pri večini od izbranih parametrov, ki so značilni za infekcijsko mononukleozo, lahko potrdimo ničelno hipotezo. Pri koncentraciji eozinofilcev, nevtrofilcev in vrednosti direktnega bilirubina pa lahko s 5 % stopnjo tveganja trdimo, da obstaja statistično značilna razlika med skupino bolnikov z IM ter bolnikov brez IM. Bolj natančno lahko rečemo, da imajo bolniki z IM statistično značilno nižje vrednosti koncentracije in števila eozinofilcev v krvi kot skupina

bolnikov brez IM ($p = 0,004$ in $p = 0,006$). Prav tako lahko na podlagi Mann – Whitney–jeve statistike trdimo, da imajo bolniki z IM statistično značilno višje vrednosti koncentracije direktnega bilirubina ($p = 0,025$), vrednosti koncentracije nevtrofilcev v krvi ($p = 0,014$) ter vrednosti koncentracije celotnega bilirubina ($p = 0,056$ – mejna vrednost) kot bolniki brez IM.

Preglednica XV: Rezultati Mann-Whitneyeve statistike

Report

	nima IM				ima IM				Mann-Whitney U statistika	p
	N	Mean	Median	povprečni rang	N	Mean	Median	povprečni rang		
št.levkocitov %	7	12,114	11,3	19,29	33	13,358	11,8	20,76	107	0,762
Limfociti $10^9/L$	7	5,257	4	24	33	4,494	3,6	19,76	91	0,383
Limfociti %	7	42,143	39	26	33	33,182	32	19,33	77	0,170
Monociti $10^9/L$	7	0,8143	0,6	19,21	33	0,8061	0,7	20,77	106,5	0,748
Monociti %	7	6,429	7	21,14	33	6,333	6	20,36	111	0,872
Eozinofilci $10^9/L$	7	0,329	0,3	31,07	33	0,076	0	18,26	41,5	0,004
Eozinofilci %	7	2,714	2	30,57	33	0,606	0	18,36	45	0,006
Bazofilci $10^9/L$	7	0,029	0	21,43	33	0,027	0	20,3	109	0,750
Bazofilci %	7	0,286	0	21,57	33	0,242	0	20,27	108	0,713
Nevtrofilci $10^9/L$	7	2,371	2,4	10,64	33	4,024	3,9	22,59	46,5	0,014
Nevtrofilci %	7	22	26	13	33	32,364	30	22,09	63	0,062
Atipični limfociti $10^9/L$	7	3	3,1	18,36	33	3,703	3	20,95	100,5	0,593
Atipični limfociti %	7	24,143	26	19,07	33	25,848	26	20,8	105,5	0,721
Plazma celice $10^9/L$	7	0,3	0,1	24,71	33	0,173	0,1	19,61	86	0,271
Plazma celice%	7	2,286	1	24,71	33	1,424	1	19,61	86	0,268
CEL.BILIRUBIN ($\mu\text{mol/L}$)	7	9,257	8	12,86	33	16,061	10	22,12	62	0,056
DIR.BILIRUBIN ($\mu\text{mol/L}$)	7	3,386	3	11,64	33	9,364	4	22,38	53,5	0,025
AP ($\mu\text{kat/L}$)	7	2,5771	2,67	15,29	33	3,9958	2,91	21,61	79	0,194
AST ($\mu\text{kat/L}$)	7	1,5829	1,44	17,86	33	2,5518	1,52	21,06	97	0,510
ALT ($\mu\text{kat/L}$)	7	2,4843	1,1	15,79	33	3,4664	2,11	21,5	82,5	0,240
γ -GT ($\mu\text{kat/L}$)	7	0,9086	0,51	13,86	33	2,22	1,58	21,91	69	0,098
S-CRP (mg/L)	7	26,1429	12	17,14	32	33,9375	24,5	20,63	92	0,464

4.4. POVEZANOST HITREGA TESTA S STAROSTJO

Namen diplomske naloge je med drugimi bil tudi ta, da preverimo povezanost dveh nominalnih spremenljivk, in sicer natančnost hitrega testa v odvisnosti od starosti

preiskovancev z infekcijsko mononukleozo. Zaradi podatkov iz literature [1, 9, 44, 45], da je hitri test manj zanesljiv pri otrocih do 4-ega leta starosti, smo najprej testirali omenjeno hipotezo. Ker pa smo pri našem vzorcu preiskovanih imeli le dva otroke, ki sta stara do 4-ih let, in se je še pri enem na podlagi specifičnih seroloških testov izkazalo, da nima infekcijske mononukleoze, smo se odločili, da bomo testirali povezanost natančnosti hitrega testa glede na starost otrok do 12-ega leta, ter mladostnikov in odraslih od 12-ega leta naprej. Starostno mejo 12-ih let smo prav tako zasledili v literaturi [6].

Pri testiranju smo uporabili Fisherjev eksaktni test. Najprej smo s pomočjo kontingenčne 2X2 tabele (preglednica XVI) prikazali dejanske frekvenčne vrednosti. Pri tem smo bolnike z IM razdelili glede na rezultate hitrega testa (pozitiven – 1, negativen – 0) ter glede na starost (do in nad 4 let). Postavili smo ničelno hipotezo, da je hitri test manj zanesljiv pri bolnikih do četrtega leta starosti. Alternativna hipoteza temu nasprotuje in pravi, da hitri test ni manj zanesljiv pri bolnikih do četrtega leta starosti.

Preglednica XVI: Prikaz kontingenčne tabele: zanesljivost hitrega testa * starost (mejna vrednost 4 leta)

			Starost		Vsota
			do 4 leta	nad 4 let	
HITRI TEST	0	Število	1	7	8
		% Starost	100,00%	21,90%	24,20 %
	1	Število	0	25	25
		% Starost	0,00%	78,10%	75,80 %
Vsota		Število	1	32	33
		% Starost	100,00%	100,00%	100,00 %

Že iz preglednice XVI je razvidno, da je v naši skupini bolnikov le en v starosti do 4 leta imel okužbo in jo je hitri test tudi zaznal. Pri bolnikih nad 4 letom starosti je hitri test zaznal 78,1 % bolnikov z IM, pri 21,9 % bolnikih ni zaznal bolezni, kljub potrjeni diagnozi. Zaradi premajhnega števila preiskovancev pod 4 letom starosti nam Fisherjev eksaktni test (Preglednica XVII) ne da relevantnih rezultatov. Z dovolj veliko gotovostjo ($p = 0,242$) ne moremo potrditi povezanosti med točnostjo hitrega testa in starostjo bolnikov z IM. Zavržemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Testa Chi – kvadrat ne moremo uporabiti, saj ima več kot ena celica s pričakovano frekvenčno vrednostjo manj kot pet enot.

Preglednica XVII: Rezultati Fisher-jevega eksaktnega testa

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearsonov Hi-kvadrat	3,223(b)	1	0,073		
Popravek (a)	0,373	1	0,542		
Verjetnostno razmerje	2,934	1	0,087		
Fisherjev eksaktni test				0,242	0,242
Linear-by-Linear Association	3,125	1	0,077		
N	33				
a) izračunana za kontingenčno tabelo 2X2					
b) 2 celici (50,0%) imata pričakovane vrednosti manjše od 5. Najmanjša pričakovana vrednost je 0,24.					

Na enak način smo bolnike z IM primerjali glede na starost do ali nad 12 let ter pozitivnim (1) ali negativnim (0) rezultatom hitrega testa. Iz preglednice XVIII je razvidno, da je v starosti do 12 let hitri test zaznal 58,3 % bolnikov, v starosti nad 12 let pa 85,7 % bolnikov.

Preglednica XVIII: Prikaz kontingenčne tabele: zanesljivost hitrega testa * starost (mejna vrednost 12 let)

			Starost		Vsota
			do 12 let	nad 12 let	
HITRI TEST	0	Število	5	3	8
		% Starost	41,70%	14,30%	24,20%
	1	Število	7	18	25
		% Starost	58,30%	85,70%	75,80%
Vsota		Število	12	21	33
		% Starost	100,00%	100,00%	100,00%

Rezultat Fisherjevega eksaktnega testa nam podaja preglednica XIX. Povezanost med točnostjo hitrega testa in starostjo se nekoliko nakazuje, vendar je na podlagi Fisherjevega eksaktnega testa ne moremo z dovolj veliko gotovostjo potrditi ($p = 0,106$).

Preglednica XIX: Rezultati Fisher-jevega eksaktnega testa

	Vrednost	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearsonov Hi-kvadrat	3,117(b)	1	0,077		
Popravek (a)	1,805	1	0,179		
Verjetnostno razmerje	3,029	1	0,082		
Fisherjev eksaktni test				0,106	0,091
Linear-by-Linear Association	3,023	1	0,082		
N	33				
a) izračunana za kontingenčno tabelo 2X2					
b) 1 celica(25,0%) ima pričakovane vrednosti manjše od 5. Najmanjša pričakovana vrednost je 2,91.					

Tudi tukaj testa Chi – kvadrat ne moremo uporabiti zaradi ene celice, ki ima pričakovano frekvenčno vrednostjo manj kot pet enot.

4.5. KORELACIJA MED PARAMETRI

Korelacijska analiza nam opredeljuje moč povezave med dvema ali več spremenljivkami. Za ovrednotenje povezave med spremenljivkami smo se zaradi nenormalnih distribucij poslužili Spearmanovega korelacijskega koeficienta. Z izračuni Spearmanovega korelacijskega koeficienta smo poskušali ugotoviti kakšna je povezava med posameznimi spremenljivkami in katere od spremenljivk so najbolj povezane. Območje vrednosti koeficienta sega od -1 do $+1$. Višje absolutne vrednosti pomenijo višjo stopnjo linearne povezave. Vrednost -1 predstavlja popolno negativno povezanost med spremenljivkama, kar pomeni, da se vrednosti ene spremenljivke zmanjšujejo z večanjem vrednosti druge spremenljivke. Obratno, pa vrednost $+1$ predstavlja popolno pozitivno povezanost med spremenljivkama, kar pomeni, da z naraščanjem vrednosti ene spremenljivke narašča tudi druga spremenljivka. Vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta 0 označuje ničelni vpliv ene spremenljivke na drugo.

V Prilogi 7 so predstavljene vrednosti Spearmanovega korelacijskega koeficienta med posameznimi parametri. Ničelna hipoteza pravi, da je korelacija nesignifikantna ($r_0 = 0$).

In v primeru $p < 0,05$ ničelno hipotezo zavrnilo in sprejmemo alternativno, ki ničelno hipotezo nasprotuje.

V našem primeru smo ugotovili, da obstaja signifikantna povezava med številčno koncentracijo levkocitov in limfocitov, številom in deležem nevtrofilcev, številom atipičnih limfocitov ter koncentracijo direktnega bilirubina. In sicer s povečanjem števila levkocitov se povečuje število limfocitov ($r = 0,658$, $p = 0,000$) prav tako se povečuje število nevtrofilcev ($r = 0,582$, $p = 0,000$), število atipičnih limfocitov ($r = 0,584$, $p = 0,000$) ter koncentracija direktnega bilirubina ($r = 0,385$, $p = 0,027$). Delež nevtrofilcev pa se s povečanjem števila levkocitov zmanjšuje ($r = -0,385$, $p = 0,027$).

4.6. DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Na podlagi specifične serološke diagnostike smo parametrom, ki so pomembni pri diagnostiki IM, izračunali njihovo občutljivost in specifičnost po formuli:

$$\text{Diagnostična občutljivost [\%]} = RP \times 100 / (RP + LN)$$

$$\text{Diagnostična specifičnost [\%]} = RN \times 100 / (LP + RN)$$

Izračunane vrednosti občutljivosti in specifičnosti posameznega parametra so predstavljene v Preglednici XX.

Preglednica XX: Občutljivost in specifičnost parametrov

PARAMETER		OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
ŠT. LEVKOCITOV		75,76	28,57
ŠT. LIMFOCITOV	Absolutna koncentracija	72,73	14,29
	Relativna koncentracija	69,70	0,00
ŠT. ATIPIČNIH LIMFOCITOV (več kot 10 %)	Absolutna koncentracija	100	0,00
	Relativna koncentracija	100	0,00
ŠT. MONOCITOV	Absolutna koncentracija	27,27	85,71
	Relativna koncentracija	15,15	85,71
ŠT. NEVTROFILCEV	Absolutna koncentracija	6,06	71,43
	Relativna koncentracija	72,73	0,00
KONC. CELOTNEGA BILIRUBINA		21,21	85,71
KONC. DIREKTNEGA BILIRUBINA		36,36	85,71

AKTIVNOST AP	72,72	42,86
AKTIVNOST AST	87,88	0,00
AKTIVNOST ALT	90,91	28,57
AKTIVNOST GGT	66,67	57,14
KONC. CRP	69,70	42,86

Tudi rezultate hitrega testa na heterofilna protitelesa smo ovrednotili glede na njegovo občutljivost in specifičnost.

Preglednica XXI: Občutljivost in specifičnost hitrega testa

PARAMETER	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
HITRI TEST NA HETEROFILNA PROTITELESA	75,76	85,71

Glede na podatke pridobljene iz literature, da je hitri test na heterofilna protitelesa manj občutljiv pri bolnikih mlajših od 12 let (še bolj pa omenjeni test daje lažno negativne rezultate pri otrocih mlajših od 4 let, vendar zaradi premajhnega števila bolnikov pod 4 leti tega nismo mogli dokazati), smo bolnike glede na starost razdelili na dve skupini in izračunali občutljivost in specifičnost pri obeh skupinah.

Preglednica XXII: Občutljivost in specifičnost hitrega testa glede na starost

HITRI TEST NA HETEROFILNA PROTITELESA	OBČUTLJIVOST (%)	SPECIFIČNOST (%)
Bolniki mlajši od 12 let	53,85	100,00
Bolniki starejši od 12 let	90,00	66,67

Glede na naše domneve, da je hitri test manj občutljiv pri mlajših pacientih, smo to potrdili. Občutljivost testa pri bolnikih z IM mlajših od 12 let je 53,85 %, pri starejših od 12 let pa kar 90,00 %.

5. RAZPRAVA

Infekcijska mononukleoza je virusna bolezen, ki pogosto poteka pri otrocih v subklinični obliki in jo zato težje diagnosticiramo. Pri mladostnikih se pogosteje pojavijo specifični simptomi in znaki, na podlagi katerih se lažje odločimo za diagnozo in potek zdravljenja. Mnogokrat infekcijsko mononukleozo težko ločimo od davice ali od bakterijske streptokokne angine. Belkaste obloge na nebnicah, močno pordelo mehko nebo z vidnimi pikčastimi krvavitvami in otekla nosna sluznica ter s tem oteženo dihanje skozi nos, so spremembe, ki se lahko pojavijo pri vseh treh boleznih. Pravilno diagnozo lahko tako postavimo na podlagi rezultatov laboratorijskih analiz [3, 4, 9, 10].

Za rutinsko diagnostiko se izvajajo osnovne hematološke preiskave z diferencialno krvno sliko. Značilno je povečana koncentracija levkocitov, med katerimi prevladujejo limfociti. V krvnem razmazu so prisotni atipični limfociti, ki pa niso specifični samo za infekcijsko mononukleozo. Pri bolnikih z infekcijsko mononukleozo spremljamo tudi koncentracijo nekaterih biokemijskih kazalcev v serumu (koncentracijo celokupnega in direktnega bilirubina, aktivnosti AP, ALT, AST, γ -GGT in koncentracijo CRP), ki so prav tako značilno povečani med okužbo. V serumu bolnikov se med infekcijsko mononukleozo pojavijo heterofilni aglutinini, ki jih dokazujemo s Paul-Bunnellovo reakcijo t.i. hitrim testom na heterofilna protitelesa. Tudi ta test ni povsem specifičen za diagnosticiranje infekcijske mononukleoze, vendar se v rutinski diagnostiki uporablja kot potrditveni test. Pri polovici obolelih otrok je test na heterofilna protitelesa lažno negativen, pri odraslih pa le v 10 % [1]. Dokazovanje specifičnih protiteles proti povzročitelju okužbe v serumu bolnikov je najbolj zanesljivo, ampak se testov poslužujemo le v primeru netipičnega poteka bolezni. S kvantifikacijo različnih specifičnih protiteles proti EBV lahko napovemo v kateri fazi okužbe je bolnik ali pa spremljamo potek bolezni [26, 27, 35].

Pri izvedbi diplomskega dela smo se seznanili z delom, ki ga opravljajo zaposleni v laboratoriju Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Bolj podrobno smo bili seznanjeni s potekom prihoda vzorca v laboratorij ter kasnejše ravnanje z vzorcem ter shranjevanje. Pri tem je potrebno biti previden, da ne pride do zamenjave vzorcev. Rezultati posameznih laboratorijskih testov se zapisuje v laboratorijski informacijski sistem, kjer so zapisani rezultati zahtevanih preiskav. Potrjevanje rezultatov je dvostopenjsko. Osnovne hematološke preiskave smo izvedli na hematološkem analizatorju

Coulter HmX (Becton Coulter). Pri tem smo bili seznanjeni z dnevnim umerjanjem inštrumenta ter njegovim delovanjem. Na analizatorju potekajo meritve več vzorcev hkrati. Uporaba in testiranje vzorcev na hematološkem analizatorju je zelo enostavna in skoraj popolnoma avtomatizirana. Zaradi nepravilnosti v krvnih celicah, ki jih je javil hematološki analizator, smo pripravili krvni razmaz. Analizator je javil nepravilnosti »blasts« in »variant lymphs«. To pomeni, da so v krvi prisotne nezrele celice levkocitne vrste ter atipični limfociti, zato smo pripravili krvni razmaz za mikroskopsko diferencialno krvno sliko. Pri tem pa smo naleteli na določene težave. Pri pripravi krvnega razmaza je potrebno biti zelo natančen, saj mora biti kri enakomerno in tanko nanešena na objektno stekelce. Razmazno stekelce je potrebno z enakomernim pritiskom, ter pod kotom 30 - 40°C hitro potegniti v levo, da so krvne celice v razmazu v enem sloju. Tako je krvni razmaz primeren za mikroskopiranje. Z večkratno pripravo krvnih razmazov smo pridobili pravi občutek za pravilno pripravljen krvni razmaz. Pri barvanju krvnih razmazov nismo imeli večjih tehničnih problemov. Sledil je mikroskopski pregled preparata, kateri ti vzame kar nekaj časa. V pravilno obarvanih razmazih smo dobili celična jedra obarvana vijoličasto, celična citoplazma rožnato do modro, nevtrofilne granulacije sivovijoličasto, eozinofilne granulacije oranžno, bazofilne granulacije pa temnovijoličasto. Pri mikroskopiranju je potrebno imeti veliko praktičnih večletnih izkušenj. Naučili smo se razlikovati med limfociti ter atipičnimi limfociti. Prav zaradi barvanja po Pappenheimu, pa smo na podlagi različnih barvah granulacije ter velikosti levkocitnih krvnih celic lahko točno definirali za katero celico levkocitne vrste gre. Po pregledu vseh 40-ih preparatov in štetjem 100-ih celic za vsak preparat, smo osvojili prepoznavanje vseh krvnih celic ter njihove razlike. Hitri test na heterofilna protitelesa smo izvedli po postopku brez večjih problemov. Hitri test je nespecifičen imunološki kromatografski test s katerim dokazujemo heterofilna protitelesa v vzorcu (polna kri, serum ali plazma). V vzorcu prisotna heterofilna protitelesa proti virusu infekcijske mononukleoze reagirajo z glikoproteini govejih eritrocitov in na področju ocenitve rezultata povzročijo nastanek modro obarvanega kompleksa, ki ga vidimo kot modro črto. Tako je test v nekaterih vzorcih zaznal heterofilna protitelesa in smo videli modro črto, spet v drugih ne. V laboratorijski diagnostiki se test uporablja kot potrditveni test za infekcijsko mononukleozo. Iz literature [3, 6, 9] smo našli podatke, da je hitri test na heterofilna protitelesa lahko manj občutljiv prvi teden bolezni. Poleg tega pa heterofilna protitelesa niso specifična samo za bolezen IM ter otrokom pod starostjo 4-ih let heterofilnih protiteles ne moremo dokazati, saj jih ti otroci ne razvijejo.

Zaradi vsega tega smo se odločili za serološke teste, da bi ugotovili kakšno občutljivost in specifičnost testa je med našimi preiskovanimi. Ugotavljali smo tudi ali je kakšna povezava med starostjo in točnostjo hitrega testa s statističnimi testi. Dokazovanje specifičnih protiteles proti EBV smo izvedli na analizatorju VIDAS. Tudi pri tej analizi nismo imeli večjih težav, saj je inštrument avtomatiziran in opravi vse korake sam. Pred analizo smo izvedli dnevno kalibracijo inštrumenta. Nato smo v analizatorju izbrali katero analizo oz. katera protitelesa bomo določali (EBV VCA IgM, EBV VCA/EA IgG in EBNA IgG protitelesa). Po vstavitvi reagenčnih posodic in pripadajočih SPR nastavkov z vzorci, smo v računalnik analizatorja vnesli podatke in določili pozicije vseh vzorcev ter začeli analizo. Test kvantitativno ovrednoti specifične imunoglobuline proti EBV v človeškem serumu z encimsko-imunsko reakcijo, ki je opisana v uvodu. Rezultati testa se po končani analizi avtomatsko sprintajo. Kvantitativno določene vrednosti se izpišejo kot pozitiven ali negativen rezultat ter mejna vrednost. Na podlagi rezultatov vseh treh testov smo natančno ovrednotili v kateri fazi okužbe je bolnik.

Naši preiskovani skupini 40-ih bolnikov s sumom na infekcijsko mononukleozo, smo ovrednotili izbrane parametre, ki se značilno povečajo ali pa se pojavijo med potekom bolezni. Domnevali smo, da bo pri vseh pacientih prisotna značilna levkocitna krvna slika s povečano koncentracijo levkocitov ter relativno in absolutno limfocitozo. Ob pregledu krvnih razmazov pod mikroskopom, smo pričakovali atipične limfocite, ki naj bi jih bilo nad 10 %. Mejo smo si postavili na podlagi člankov in drugih literarnih virov [1, 3, 33]. Za infekcijsko mononukleozo so značilni tudi patološki jetrni testi – povečane koncentracije jetrnih encimov [3, 7, 9, 12], katere smo prav tako vrednotili. V okviru diplomske naloge smo želeli preveriti kakšno koncentracijo serumskega CRP imajo preiskovani bolniki z infekcijsko mononukleozo. V literaturi smo zasledili podatek, da je pri vrednostih CRP nad 40 mg/l malo verjetna izključno samo virusna okužba brez prisotnosti bakterij [39]. V naši preiskovani skupini smo 67,5 % (27/40) bolnikom določili koncentracijo CRP manjšo od 40 mg/L, ostali bolniki so imeli večjo koncentracijo CRP. To nakazuje, da ima več kot večina preiskovancev nakazano virusno okužbo, se pravi infekcijsko mononukleozo, glede na koncentracijo CRP.

S specifičnimi serološkimi testi smo bolezen IM nekaterim preiskovancem potrdili, drugim ne. Primerjali smo omenjene parametre med bolniki z IM in bolniki brez nje. Zanimalo nas je tudi, ali je v naši preiskovani skupini kakšna povezava med točnostjo hitrega testa in starostjo preiskovancev. Kar nekaj člankov navaja manjšo občutljivost testa na heterofilna

protitelesa pri otrocih mlajših od štirih let [1, 9, 44, 45]. Izračunali smo korelacije med parametri v skupini bolnikov z IM. Na koncu pa smo vse teste ovrednotili z izračunom njihove občutljivosti in specifičnosti.

5.1. OPIS PREISKOVANE SKUPINE

V prvem delu raziskave smo s pomočjo deskriptivne statistike opisali celotno preiskovano skupino – bolnike s sumom na infekcijsko mononukleozo. Osnovne hematološke preiskave so pri večini preiskovanih pokazale značilno levkocitno krvno sliko kot smo tudi domnevali in pričakovali. Kar $\frac{3}{4}$ preiskovanih je imelo povečano številčno koncentracijo levkocitov, kar nakazuje na okužbo, ki je lahko povezana z številnimi bakterijami, nekaterimi virusi, ter drugimi vnetnimi reakcijami. Številčna koncentracija levkocitov nam kot samostojen test ne napove vrste okužbe. Opozori nas, da se telo s pomočjo povečanega števila levkocitov brani pred različnimi povzročitelji bolezni in drugimi vnetnimi procesi, ki potekajo v organizmu. Izmed vseh podvrst levkocitov, je pri preiskovani skupini opaziti največ limfocitov. Poleg limfocitoze je za infekcijsko mononukleozo značilna tudi prisotnost atipičnih limfocitov nad 10 % [1, 3, 33]. Atipični limfociti niso specifični samo za infekcijsko mononukleozo. Lahko se pojavijo tudi pri drugih obolenjih (ošpice, hepatitis, rdečke, mumps, toksoplazmoza, preobčutljivostne reakcije), vendar jih je pri omenjenih boleznih znatno manj. V naši preiskovani skupini je povprečna vrednost atipičnih limfocitov $3,58 \times 10^9/L$, to je 25,55 % vseh levkocitov kar nakazuje na okužbo z Epstein-Barr virusom.

Povdariti je potrebno, da je hematološki analizator pri vseh preiskovancih javil limfocitozo in prisotnost atipičnih limfocitov. Zaradi tega je bilo potrebno pripraviti krvni razmaz krvi ter diferenciacijo levkocitov pod mikroskopom. Z mikroskopsko diferencialno krvno sliko smo še bolj natančno opredelili in ovrednotili levkocite, ki so bili prisotni v krvi. Poleg povečane številčne koncentracije limfocitov je za IM značilno nekoliko povečana koncentracija monocitov [33], kar pa pri naši preiskovani skupini ni razvidno. Povprečna koncentracija monocitov je $0,81 \times 10^9/L$ krvi oziroma 6,35 % glede na celotno število levkocitov, kar je znotraj referenčnih vrednosti. Številčna koncentracija nevtrofilcev je bila pri večini (77,5 %) preiskovancev nekoliko zmanjšana na račun povečanega števila limfocitov, kar je pričakovano in značilno za IM [1, 8]. Koncentracija eozinofilcev, bazofilcev in plazmatk ni tako tipično spremenjena pri IM in je v literaturi ponavadi ne omenjajo, zato smo vrednosti samo navedli in se nismo osredotočili na njihove rezultate.

Glede na številne podatke iz literature [3, 7, 12, 33] infiltrati mononuklearnih celic prizadenejo jetrne celice, zato se pri diagnostiki spremljajo tudi koncentracije jetrnih encimov. Jetrni testi niso specifični samo za jetrne bolezni, vendar je njihova povečana koncentracija pogosto spremljajoč znak pri infekcijski mononukleozni. V preiskovani skupini smo izračunali povprečno koncentracijo celokupnega bilirubina, ki je znašala 14,87 $\mu\text{mol/L}$, kar je pod referenčno vrednostjo. Povprečna koncentracija direktnega bilirubina pa je nekoliko povečana, in sicer 8,32 $\mu\text{mol/L}$. V literaturah nismo zasledili točne mejne koncentracije celokupnega in direktnega bilirubina, katero naj bi dosegali bolniki z infekcijsko mononukleozo. Smo pa v številnih člankih [7, 12, 57, 58] zasledili, da je povečanje koncentracije celokupnega in direktnega bilirubina pri IM izjemno redko. Prav tako se pri bolnikih le redko pojavi zlatenica [58]. Naši rezultati se pri koncentraciji celokupnega bilirubina ujemajo s podatki iz literature. Samo 20 % (8/40) bolnikov je imelo povečano koncentracijo celokupnega bilirubina, ostali so imeli koncentracijo znotraj orientacijskih referenčnih vrednosti. Povečano koncentracijo direktnega bilirubina je imelo nekoliko več bolnikov, to je 32,5 % (13/40), kar je še vedno relativno malo. Na koncentracijo bilirubina v krvi prav tako lahko vpliva več dejavnikov.

Pri vseh ostalih jetrnih encimih – AP, ALT, AST in GGT smo ugotovili, da ima večina preiskovancev povečano koncentracijo v serumu. Povprečna vrednost koncentracije AP je približno 2.2 krat večja od referenčne vrednosti glede na mejno vrednost za ženske (moški imajo referenčne vrednosti nekoliko večje, zato bi bile vrednosti nekoliko manjše), povprečna vrednost koncentracije AST za skoraj 4.6 krat večje, ALT za 5.9 krat, GGT pa za 3.2 krat večje glede na referenčne vrednosti za ženske. Pri nobenem pacientu ni bilo razvite zlatenice. Rezultati so primerljivi z rezultati iz literature [7, 12], ki navajajo dva do trikrat večje koncentracije ALT in AST od referenčne vrednosti. Le 10 % (4/40) bolnikov je imelo normalno aktivnost AST, vrednosti vseh ostalih 90 % (36/40) bolnikov so bile povečane. Prav tako je večina bolnikov, 87,5 % (35/40), imela povečano aktivnost ALT in le 12,5 % (5/40) normalno. V literaturi [7] je navedeno, da se pri bolnikih z IM pojavijo povečane vrednosti ALT in AST pri 80 % bolnikov, kar se ujema z našimi rezultati. Povečano aktivnost AP so v klinični študiji določili pri 35–88 % bolnikov z IM [61], v naši raziskavi smo določili povečano aktivnost AP pri 70 % (28/40) bolnikov. Tudi aktivnost GGT je pogosto povečana pri bolnikih z IM, vendar ne tako pogosto in ne v tako visokih vrednostih kot ostali zgoraj omenjeni jetrni encimi [7]. To smo potrdili z izračunom

aktivnost GGT, ki je bila povečana pri 62,5 % (25/40) bolnikov, ostali 37,5 % (15/40) so imeli vrednosti znotraj referenčnih vrednosti.

Zaključimo lahko, da so povečane koncentracije biokemičnih parametrov, med katere štejemo koncentracijo jetrnih encimov (AP, ALT, AST in GGT), spremljajoči znak pri infekcijski mononukleози. Tako so nam lahko v veliko pomoč pri sami postavitvi diagnoze. Pri naši preiskovani skupini smo tako na podlagi osnovnih hematoloških preiskav, diferencialne krvne slike in na podlagi koncentracij biokemičnih parametrov postavili sum na bolezen IM.

Pri značilnem poteku bolezni in pri značilni klinični sliki so za diagnosticiranje IM dovolj osnovne hematološke preiskave krvi, diferencialna krvna slika ter biokemični parametri – koncentracija direktnega in celokupnega bilirubina ter koncentracije jetrnih encimov (AP, ALT, AST in GGT) [27, 41, 42, 58]. Vsi ti parametri, v kolikor so značilno povečani oziroma nekoliko znižani, so v kombinaciji zelo specifični in občutljivi za napoved diagnoze IM, vendar še vedno ne zadostujejo za točno postavitev diagnoze [1, 3, 6, 9]. V rutinski diagnostiki se kot potrditveni test uporablja hitri test na heterofilna protitelesa. Vsem preiskovancem smo tako izvedli omenjeni test, ki pa je manj občutljiv pri otrocih pod 4-im letom starosti [1, 9]. Da pa smo preverili to hipotezo, smo preiskovancem s specifičnimi serološkimi testi najprej potrdili diagnozo IM. Izmed vseh 40-ih preiskovancev, smo 33-im potrdili bolezen IM, le 7-im komplet za določanje specifičnih protiteles proti EBV ni zaznal dovolj protiteles in smo jim bolezen IM izključili.

5.2. PRIMERJAVA PARAMETROV MED BOLNIKI Z IN BREZ INFEKCIJSKE MONONUKLEOZE

Na podlagi specifične laboratorijske diagnostike smo ločili bolnike z IM ter ostale bolnike, ki niso imeli IM. Skupini smo primerjali med sabo. Zanimalo nas je ali je opazna kakšna razlika med parametri. Zaradi nenormalne porazdelitve podatkov smo se za statistično obdelavo podatkov poslužili neparametričnih testov. Ugotovili smo, da se skupini bolnikov z IM in brez IM zelo ujemata v izbranih parametrih, kar je pričakovano, saj smo bolnike s sumom na IM izbrali na podlagi rezultatov laboratorijskih testov. Vsi preiskovanci so imeli značilno krvno sliko. V primerjavi z bolniki, katerim nismo diagnosticirali EBV okužbe, je povprečno število levkocitov primerljivo z bolniki z infekcijsko mononukleozo. Bolniki z IM so imeli povprečno koncentracijo levkocitov $13,4 \times 10^9/L$, preiskovanci brez diagnosticirane IM pa so imeli povprečno koncentracijo levkocitov $12,1 \times 10^9/L$. Tudi

vrednosti limfocitov so primerljive. Bolniki z IM so imeli povprečno koncentracijo limfocitov $8,2 \times 10^9/L$ (61,4 % glede na vse levkocite), bolniki brez IM pa nekoliko večje koncentracije $8,3 \times 10^9/L$ (68,5 % glede na vse levkocite). Podobno smo opazili tudi pri koncentracijah monocitov, bazofilcev, plazmatk ter vseh koncentracijah jetrnih encimov (AP, AST, ALT, GGT). Čeprav smo opazili nekoliko povečane koncentracije vseh jetrnih encimov (Preglednica XV, stran 44) pri bolnikih z IM, ta razlika ni bila statistično značilna.

Vseeno pa smo z Mann – Whitney–jevo statistiko, s 5 % stopnjo tveganja, uspeli zaznati razlike med preiskovanima skupinama. Bolniki z IM imajo statistično značilno nižje vrednosti številčne koncentracije eozinofilcev v krvi v primerjavi s skupino bolnikov brez IM ($p = 0,004$ in $p = 0,006$). Številčna koncentracija eozinofilcev v krvi ni specifični marker pri diagnostiki IM, zato nam ta statistično značilna razlika med skupino bolnikov z IM in bolnikov brez IM, ne pomaga pri zaključkih o razliki med skupinama. Ugotovili smo tudi, da imajo bolniki z IM statistično značilno večjo koncentracijo direktnega ($p = 0,025$) in celokupnega ($p = 0,056$ – mejna vrednost) bilirubina ter značilno večjo številčno koncentracijo nevtrofilcev v krvi ($p = 0,014$) kot bolniki brez IM. Pri tem se moramo zavedati, da je bilo bolnikov brez IM le 7, tako da bi bilo za bolj natančne zaključke potrebno pridobiti večje število preiskovancev s simptomi in kliničnimi znaki ter klinično sliko podobno IM. Poleg tega lahko pride do razlik med skupinama zaradi starostne razlike med bolniki z IM in brez nje. Otroci imajo ponavadi večje vrednosti krvnih celic, ter vrednosti jetrnih encimov zaradi njihove drugačne strukture in zgradbe telesa [59]. V našem primeru je povprečna starost v skupini z IM 16 let in v skupini brez IM 18 let. Je pa v skupini brez IM zelo velika starostna razlika med preiskovanimi. Preiskovanci so bili stari 53, 24, 40, 2, 4, 2 in 3 leta. Koncentracija jetrnih encimov v serumu je različna pri moških in ženskah, kar je razvidno tudi pri mejnih referenčnih vrednostih, ki so za moške nekoliko večje kot za ženske. Tudi to lahko vpliva na interpretacijo rezultatov. Zato je pri sklepanju zaključkov pri raziskavi potrebno upoštevati vse omenjene parametre, ki bi lahko vplivali na rezultate.

5.3. POVEZANOST HITREGA TESTA S STAROSTJO

Pri bolnikih z IM smo ugotavljali povezanost med starostjo bolnikov ter točnostjo hitrega testa. Iz številnih virov iz literature je navedeno [1, 9], da je hitri test manj občutljiv pri otrocih mlajših od štirih let. Prišli smo do zaključkov, da imamo premalo preiskovancev

starih pod 4 leta, da bi lahko to hipotezo potrdili. V naši preiskovani skupini je bil le 1 otrok z infekcijsko mononukleozo in tega je hitri test tudi zaznal. Povezanost hitrega testa smo primerjali tudi glede na mejno starost do 12 let. Iz literature [6] smo namreč zasledili podatek, da je hitri test na heterofilna protitelesa manj občutljiv pri bolnikih mlajših od 12 let. Test naj bi zaznal samo 25–50 % bolnikov mlajših od 12 let v primerjavi s starejšimi bolniki, katerih test je zaznal od 71–91 % [6]. V naši raziskavi smo ugotovili, da se povezanost med natančnostjo hitrega testa in starostjo nekoliko nakazuje, vendar je na podlagi Fisherjevega eksaktnega testa ne moremo z dovolj veliko zanesljivostjo potrditi ($p = 0,106$). To nam kažejo tudi naši rezultati, saj je hitri test v starosti otrok do 12 let zaznal le 58,3 % bolnikov, v starosti bolnikov nad 12 let pa kar 85,7 % bolnikov z infekcijsko mononukleozo. Naši rezultati se kar dobro ujemajo s podatki iz literature [6]. Naš hitri test na heterofilna protitelesa je zaznal nekoliko večje število (58,3 %) bolnikov mlajših od 12 let kot je navedeno v literaturi [6]. V skupini bolnikov do 12 let smo imeli 16 bolnikov, s povprečno starostjo 7 let. Pri otrocih je lahko test na heterofilna protitelesa lažno negativen v več primerih. Otroci pogosto heterofilnih protiteles ne razvijejo, zaradi še ne dovolj dobro razvitega imunskega odziva, zato jih v krvi ne moremo dokazati [1, 9, 44, 45]. Heterofilna protitelesa se v krvi pojavijo pri 85 % bolnikov z IM v prvih sedmih dneh po nastopu simptomov [10]. Lahko je prišlo do odvzema krvi pred nastankom heterofilnih protiteles. Heterofilna protitelesa so prisotna v krvi še 12 mesecev po akutni okužbi [10, 60], zato je potrebno biti pazljiv pri vrednotenju pozitivnega hitrega testa. Ob pozitivnem rezultatu hitrega testa na heterofilna protitelesa (Clearview IM) lahko diagnozo IM postavimo v kombinaciji z značilnimi kliničnimi znaki in značilno krvno sliko [60]. Za infekcijsko mononukleozo je značilno, da okužba pri otrocih poteka v subklinični obliki, simptomi pa so podobni angini. Bolezen ponavadi kmalu izzveni in ne prihaja do nobenih zapletov, zato bolniki ne iščejo zdravniške pomoči, ampak si sami lajšajo simptome. Zaradi tega je zelo težko pridobiti večje število preiskovancev s starostjo pod 4- mi leti. Potrebno bi bilo zbirati paciente v širši okolici ter daljše časovno obdobje.

5.4. KORELACIJA MED PARAMETRI

Zanimalo nas je ali obstaja kakšna povezava med parametri. To smo ugotavljali z izračunom Spearmanovega korelacijskega koeficienta, ki nam pove stopnjo povezanosti med spremenljivkami. Izmed vseh različnih možnih povezav, ki so predstavljene v Prilogi 7, smo ugotovili, da je kar nekaj povezav značilnih za infekcijsko mononukleozo. In sicer s

povečanjem koncentracije levkocitov se povečuje koncentracija limfocitov ($r_o = 0,658$, $p = 0,000$) prav tako se povečuje koncentracija nevtrofilcev ($r_o = 0,582$, $p = 0,000$), koncentracija atipičnih limfocitov ($r_o = 0,584$, $p = 0,000$) ter koncentracija direktnega bilirubina ($r_o = 0,385$, $p = 0,027$). Relativna koncentracija nevtrofilcev pa se s povečanjem števila levkocitov zmanjšuje ($r_o = -0,385$, $p = 0,027$). Pri interpretaciji povezave med spremenljivkami moramo paziti, saj nam vrednost Spearmanovega korelacijskega koeficienta pove le kakšen je odnos oziroma moč povezave med spremenljivkami, ne pove nam nič o številčnih vrednostih parametrov ali so povišane ali ne. S povečanjem koncentracije limfocitov se povečuje število levkocitov ($r_o = 0,658$, $p = 0,000$) ter koncentracija atipičnih limfocitov ($r_o = 0,545$, $p = 0,001$), zmanjšuje pa se relativno število nevtrofilcev ($r_o = -0,754$, $p = 0,000$), šibka povezava pa kaže tudi na zmanjšanje relativnega števila monocitov ($r_o = -0,385$, $p = 0,027$). Omeniti je potrebno tudi korelacijo med koncentracijami jetrnih encimov.

Vse zgoraj omenjene povezave so logične in pričakovane. Za infekcijsko mononukleozo je značilna povečana številčna koncentracija levkocitov, med katerimi prevladujejo limfociti. Specifično je povečana številčna koncentracija atipičnih limfocitov, ki je v tako velikem odstotku specifična za IM [3, 9]. Številčna koncentracija nevtrofilcev v krvi načeloma ni povečana, kot smo dobili v rezultatih, saj je za IM značilno, da se pri 60–90 % bolnikov pojavi relativna in absolutna nevtropenija [8]. Relativna koncentracija nevtrofilcev pa se zmanjšuje, kar je tudi pričakovano glede na celotno številčno koncentracijo levkocitov. Tudi koncentracija direktnega bilirubina se v primerjavi s povečanjem številčne koncentracije limfocitov povečuje. Pri IM je namreč povečanje koncentracije direktnega bilirubina pri IM izjemno redko [57, 58].

5.5. OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Vsem laboratorijskim testom, ki jih merimo in uporabljamo pri diagnostiki za infekcijsko mononukleozo smo izračunali njihovo občutljivost in specifičnost. Ta izračun nam napove sposobnost testa, da zazna resnično bolne (občutljivost), ter resnično zdrave (specifičnost). Poleg Fisherjevega eksaktnega testa, s katerim smo preverili povezavo med točnostjo hitrega testa in starostjo preiskovancev, smo občutljivost in specifičnost hitrega testa primerjali med skupino bolnikov do 12-ega leta starosti (17 preiskovancev) in skupino nad 12-im letom starosti (23 preiskovancev).

Občutljivost smo računali 33 preiskovancem glede na specifične serološke teste s katerimi smo potrdili bolezen. Nato smo glede na povečane vrednosti različnih parametrov določili resnično pozitivne ter lažno negativne, ter tako izračunali občutljivost. Visoka občutljivost povečanja števila levkocitov in limfocitov pri bolnikih z IM nakazuje, da testa relativno dobro zaznata resnično bolne, vendar to še ne pomeni, da sta dovolj specifična. Dobro vemo, da povečana koncentracija levkocitov in limfocitov v krvi lahko nakazuje na katerokoli vrsto okužbe, bakterijsko ali virusno, ter na različna vnetna stanja. Nizko občutljivost smo izračunali parametrom, in sicer številu monocitov, številu nevtrofilcev v krvi ter koncentraciji celokupnega in direktnega bilirubina. Ti parametri tudi sami po sebi niso specifični za infekcijsko mononukleozo, vendar so v kombinaciji z ostalimi rezultati analiz dober pokazatelj bolezni. Vsem jetrnim encimom smo izračunali visoko občutljivost, kar je bilo tudi pričakovano. Za infekcijsko mononukleozo je to značilno in je tudi navedeno v številnih člankih [7, 12].

Specifičnost parametrov smo računali 7 preiskovancem, kar je relativno zelo malo. Izračunane vrednosti specifičnosti parametrov so zato manj zanesljive, oziroma imajo zelo širok interval zaupanja, ki pa ga nismo računali. Najvišjo specifičnost smo izračunali tistim testom, kateri imajo slabšo občutljivost in to so število monocitov, število nevtrofilcev v krvi ter koncentraciji celokupnega in direktnega bilirubina.

Občutljivost in specifičnost smo določili tudi hitremu testu na heterofilna protitelesa. Proizvajalec testa na heterofilna protitelesa (Clearview IM) navaja pri testiranju polne krvi 95,5 % občutljivost in 100 % specifičnost testa [60]. V navodilih pa je omenjeno tudi, da otroci s starostjo pod 4 leti v 50 % ter odrasli 10–20 % ne proizvedejo heterofilnih protiteles [60]. Glede na vse preiskovance (40 bolnikov s sumom na IM), smo izračunali občutljivost hitrega testa, ki je znašala 75,5 %, ter specifičnost 85,7 %. Glede na našo majhno skupino preiskovancev s sumom na IM, sta specifičnost in občutljivost nižja kot jih navaja proizvajalec. Pri večjem številu preiskovancev bi se lahko bolj približali rezultatom iz literature. Tukaj je nadvse pomembna tudi povprečna starost preiskovancev, zaradi zgoraj navedene starostne omejitve. Povprečna starost preiskovancev v naši skupini je bila 16 let. Zaradi nizke povprečne starosti preiskovancev v naši skupini, je to lahko vzrok za razliko z rezultati, ki jih navaja proizvajalec.

Ko smo preiskovance razdelili v dve starostni skupini do 12 (17 preiskovancev) in nad 12 let (23 preiskovancev), pa smo dobili pričakovane rezultate. Občutljivost testa pri preiskovanih do 12 let je bila 53,9 %, pri preiskovanih nad 12 let pa kar 90,0 %. S tem smo

dokazali, da je hitri test pri otrocih pod 12-im letom starosti manj občutljiv kot pri mladostnikih nad 12 let in starejšim [6]. Glede na podatke iz literature [6] so dobljeni rezultati občutljivosti hitrega testa primerljivi. V literaturi sicer navajajo, da je hitri test manj občutljiv pri otrocih pod 4 letom starosti, vendar na podlagi naše preiskovane skupine tega nismo mogli potrditi. Imeli smo namreč premajhno število bolnih otrok mlajših od štirih let.

6. SKLEPI

V okviru raziskave pri diplomski nalogi z naslovom: »Klinični pomen določanja izbranih biokemičnih in seroloških markerjev pri infekcijski mononukleози« smo na podlagi rezultatov različnih laboratorijskih analiz pri bolnikih s sumom na infekcijsko mononukleozo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Povečana koncentracija levkocitov v krvi je eden od kazalcev okužbe z EBV.
- Bolniki z infekcijsko mononukleozo imajo povečano številčno koncentracijo in relativno vrednost limfocitov.
- Vsi preiskovanci imajo značilno levkocitno krvno sliko, atipičnih limfocitov je več kot 10 %.
- Večina bolnikov z infekcijsko mononukleozo ima povečano aktivnost jetrnih encimov, in sicer AP, AST, ALT in GGT.
- Bolniki z IM imajo v primerjavi z bolniki brez IM statistično značilno večjo koncentracijo direktnega bilirubina ($p = 0,025$), številčno koncentracijo nevtrofilcev v krvi ($p = 0,014$) ter koncentracijo celokupnega bilirubina ($p = 0,056$ – mejna vrednost).
- Pri večini bolnikov z infekcijsko mononukleozo koncentracija serumskega CRP ne presega 40 mg/L.
- Zanesljivost testa na heterofilna protitelesa je večja pri bolnikih nad 12 let.
- Test na heterofilna protitelesa je manj diagnostično občutljiv pri skupini bolnikov, ki so mlajši od 12 let.
- Povezanost med točnostjo hitrega testa in starostjo se nekoliko nakazuje, vendar je na podlagi Fisherjevega eksaktnega testa ne moremo z dovolj veliko gotovostjo potrditi ($p = 0,106$).
- Pri izračunu korelacije med parametri smo ugotovili povezanost med koncentracijo levkocitov, limfocitov, atipičnih limfocitov, nevtrofilcev ter direktnim bilirubinom.
- S kombinacijo treh seroloških testov smo lahko ovrednotili fazo okužbe preiskovancev.

7. LITERATURA

1. Jenson H B: Epstein-Barr virus. *Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics* 2011 Sep; 32 (9): 375–383; quiz 384.
2. Cowan M K: *Microbiology a sistem approach*. 3rd Edition. The McGraw-Hill Companies; 2012.
3. Marolt Gomišček M, Radšel Medvešček A: *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Tangram; 2002.
4. Poljak M, Petrovec M: *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011.
5. Effrey J, Ohen C I: Epstein-Barr virus infection. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 481–492.
6. Ebell M H: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *American family physician* 2004 Oct; 70 (7): 1279–87.
7. Hara S, Hoshino Y, Naitou T, Nagano K, Iwai M, Suzuki K, Yamamoto K, Nagasaka T, Morishima T, Kimura H: Association of virus infected-T cell in severe hepatitis caused by primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2006 Mar; 35 (3): 250–6.
8. J. Bain B: *Blood cells: a practical guide*. Philadelphia: Lippincott; London; New York: Gower Medical Publishing; 1989.
9. Odumade O A, Hogquist K A, Balfour H H: Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews* 2011 Jan; 24 (1):193–209.

10. Hurt C, Tammara D. Diagnostic Evaluation of Mononucleosis-Like Illnesses. 2007; 1–8.
11. Macsween K F, Crawford D H: Reviews Epstein-Barr virus — recent advances. 2003; 3 (March): 131–140.
12. Kofteridis D P, Koulentaki M, Valachis A, Christofaki M, Mazokopakis E, Papazoglou G, Samonis G: Epstein Barr virus hepatitis. European journal of internal medicine 2011 Feb; 22 (1): 73–6.
13. <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=106674>, 13.11.2012.
14. Buchwald D S, Rea D T, Katon J W, Russo E J, Ashley L R: Acute Infectious Mononucleosis: Characteristics of Patients Who Report Failure to Recover. The American Journal of Medicine 2000 Nov; Vol. 109: 531–537.
15. Gershburg E, Pagano J S: Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2005 Aug; 56 (2): 277–81.
16. Candy B, Chalder T, Cleare A J, Wessely S, White P D, Hotopf M: Recovery from infectious mononucleosis: a case for more than symptomatic therapy? A systematic review. The British journal of general practice: the journal of the Royal College of General Practitioners 2002 Oct; 52 (483): 844–51.
17. Talaro K P. Foundations in microbiology. 7th Editio. New York: The McGraw-Hill Companies; 2009.
18. Young L S, Rickinson A B: Epstein-Barr virus: 40 years on. Nature reviews. Cancer 2004 Oct; 4 (10): 757–68.
19. Weiss L M: Epstein-Barr Virus and Hodgkin ' s Disease. Current Oncology Reports 2000; 2: 199–204.
20. Kutok J L, Wang F: Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. Annual review of pathology 2006 Jan; 1: 375–404.
21. <http://stdgen.northwestern.edu/stdgen/bacteria/hhv2/herpes.html>, 13.11.2012.

22. <http://www.hindawi.com/journals/cdi/2012/370516/fig1/>, 13.11.2012.
23. Williams H, McAulay K, Macsween K F, Gallacher N J, Higgins C D, Harrison N, Swerdlow A J, Crawford D H: The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *British journal of haematology* 2005 Apr; 129(2): 266–74.
24. A.Rezk S., M.Weiss L.: Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Human pathology* 2007 Sep; 38 (9): 1293–304.
25. Rickinson A, others: Epstein-Barr virus. *Virus research*, Elsevier Science B. V. 2002; 82 (1–2): 109–113.
26. Gulley M L, Tang W: Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 2008 Jul; 10 (4): 279–92.
27. Hess R D: Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 years. *Journal of clinical microbiology* 2004 Avg; Vol. 42, No. 8: 3381–3387.
28. Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H: Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8⁺ T cells in acute infectious mononucleosis. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2011 Mar; 50 (3): 244–6.
29. Papesch M, Watkins R: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 2001 Jan, Vol. 26, Issue 1, 3–8.
30. Keun Hyung Son, Mee Yong Shi: Clinical features of Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis in hospitalized Korean children. *Korean J Pediatr*; 2011 October; 54 (10): 409–413.
31. Linderholm M, Jens B, Juto P, Linde A: Comparative Evaluation of Nine KIIts for Rapid Diagnosis of Infectious Mononucleosis and Epstein-Barr Virus-Specific Serology. *Journal of clinical microbiology* 1994 Jan; Vol. 32, No:259–261.

32. Lužnelhar A T, Kuželički K N, Milek M, Pajič T: Vaje iz klinične kemije I Študijsko gradivo za študente UŠ farmacije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo; 2010.
33. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Koželj M, Černelč P: Interna medicina. 4. izdaja. Ljubljana: Slovensko medicinsko društvo; 2011.
34. Keramidas D C, Antoniou D, Marinos L: Infectious mononucleosis manifested as a cecal mass. *Journal of pediatric surgery* 2007 Jul; 42 (7): 1295–7.
35. Vladimir K: Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo; 2011.
36. Berce K, Božnar Alič E, Podgornik H, Trampuš Bakija A, Žontar D: Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo; 2012.
37. <http://ninizaw.blogspot.com/2008/02/httplibrary.html>. 13.11.2012.
38. www.dr-gorkic.si: C - reaktivni protein (CRP) v zdravniški praksi. 13.11.2012.
39. Korppi M, Kröger L: C-reactive protein in viral and bacterial respiratory infection in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1993; 207–213.
40. Toussiroit E, Roudier J: Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2008; Vol. 22, No: 883–896.
41. E.Farhat S, Finn S, Chua R, Smith B, E.Simor A, George P, B.Diena B, Diena D, Skulnick M: Rapid Detection of Infectious Mononucleosis-Associated Heterophile Antibodies by a Novel Immunochromatographic Assay and Latex Agglutination Test. *Journal of clinical microbiology* 1993 Jun; 31: 1597–1600.
42. Bruu a L, Hjetland R, Holter E, Mortensen L, Natås O, Petterson W, Skar a G, Skarpaas T, Tjade T, Asjø B: Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2000 May; 7 (3): 451–6.

43. Altuglu I, Bozkurt H, Samlioglu P, Zeytinoglu A: Evaluation of three different assays for the assessment of Epstein Barr Virus immunological status. *New Microbiologica* 2007; 30: 393–398.
44. Valent Sumaya C, Ench Y: Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis in Children: II. Heterophil Antibody and Viral-Specific Responses. *Pediatrics, Official journal of the american academy of pediatrics* 1985; 75: 1011–1019.
45. Tsuchiya S: Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology Elsevier Science Ireland* 2002; 44: 227–238.
46. Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya J M, Shoenfeld Y: Epstein Barr Virus and Cytomegalovirus in Autoimmune Diseases: Are They Truly Notorious? A Preliminary Report. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007 Jun; 1108 (1): 567–577.
47. Zeytinoglu A, Altuglu I, Karatas E, Sertozy R Y: Comparison of immunofluorescence assay and multiplexed microparticle - based immunoassay for detecting Epstein - Barr virus viral capsid antigen antibodies. *Journal of Virological Methods* 2009 Aug; 300–302.
48. Sener A G, Afsara I, Pinar E: Evaluation of Epstein–Barr virus antibodies, anti-VCA avidity by immunofluorescence and immunoblot assays for assessment of Epstein–Barr virus immunologic state. *Journal of Virological Methods* 2009; Vol. 159, Issue 2: 300–302.
49. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
50. <http://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/>. 13.11.2012.
51. Rea T D, Ashley R L, Russo J E, Buchwald D S: A Systematic Study of Epstein-Barr Virus Serologic Assays Following Acute Infection. 2002; 156–161.

52. Debyser Z, Reynders M, Goubau P DJ: Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Clinical and diagnostic virology* 1997; 8: 71–81.
53. Feng Z, Li Z, Sui B, Xu G XT: Serological diagnosis of infectious mononucleosis by chemiluminescent immunoassay using capsid antigen p18 of Epstein-Barr virus. *Elsevier science* 2004; 77–82.
54. Adamič Š: Temelji biostatistike. 2. izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani - Inštitut za biomedicinsko informatiko; 1989.
55. Bolton S: Pharmaceutical statistics, Practical and Clinical Applications. 3rd editio. New York: Drugs and the pharmaceutical sciences; 1997.
56. Blair R C, A.Taylor R: Biostatistics for the health sciences. New Jersey: Pearson Prentice Hall; 2008.
57. Shuster F, Ognibene J A: Dissociation of serum bilirubin and Alkaline phosphatase in infectious mononucleosis. *JAMA*, 14.julij, 1969; 267-268.
58. Corr P W, Scian F L: Deep Jaundice in infectious mononucleosis. *JAMA*, 7.julij, 1962; 52-54.
59. Tabele priporočenih referenčnih vrednosti; Laboratorijsko diagnostični oddelki, Pediatrična klinika, Ljubljana (Povzeto po: Hematology of Infancy and Childhood, ed. D.G. Nathan, F.A. Oski, S.H. Orkin, 5th Ed., W.B. Saunders Company, printed in USA, 1997)
60. Clearview IM, Navodila za uporabo
61. Futterweit W: Serum alkaline phosphatase activity in infectious mononucleosis; A clinical study of fifty – five cases. *Arch. Intern. Med.*, 1961, Vol. 108, No. 2, 253-268.

PRILOGE:

Priloga 1: Pogostost simptomov, znakov in laboratorijskih kazalcev ter značilnosti pri infekcijski mononukleози [9]

		Prevalenca (%)
Simptomi	Bolečine v grlu	95
	Utrujenost	90
	Glavobol	75
	Vročina	70
	Bolečine po telesu	50
	Pomankanje apetita	50
	Bolečine v trebuh	40
Znaki	Vnetje sluznice žrela	100
	Povečanje vratnih bezgavk	95
	Vročina	50
	Hepatomegalija-močno povečanje jeter	25
	Splenomegalija-povečanost vranice	33
	Edem vek	10
	Izpuščaji	5
Laboratorijski kazalci	Povečana aktivnost alanin-aminotransferaze	80
	Levkocitoza - povečanje številčne koncentracije levkocitov v krvi	40
	Trombocitopenija-zmanjšana številčna koncentracija trombocitov v krvi	25
	Anemija	10

Priloga 2: Referenčne vrednosti eritrocitne krvne slike

Eritrocitna krvna slika	Vrednosti
številčna koncentracija eritrocitov	4.5–6.3 × 10 ¹² /L moški 4.2–5.4 × 10 ¹² /L ženske
koncentracija hemoglobina	140–180 g /L moški 120–160 g /L ženske
volumen stisnjenih eritrocitov (VSE) ali hematokrit	0.40–0.54 moški 0.37–0.47 ženske
Eritrocitni indeksi	
povprečni volumen eritrocitov-PVE (MCV)	81–94 fL
povprečna količina hemoglobina v eritrocitih-PHE (MCH)	26–32 pg
povprečna koncentracija hemoglobina v L eritrocitov PKHE (MCHC)	310–350 g/L

Priloga 3: Referenčne vrednosti levkocitne krvne slike

Levkocitna krvna slika	Vrednosti	
številčna koncentracija levkocitov	$4.0\text{--}10.0 \times 10^9/\text{L}$	
Celice levkocitne krvne slike	Relativna koncentracija (%)	Absolutna koncentracija ($\times 10^9/\text{L}$)
nevtrofilci	40–75	1.6–7.5
limfociti	20–50	0.8–5.0
monociti	2–10	0.1–1.0
eozinofilci	1–6	0.1–0.6
bazofilci	0–2	0.0–0.2

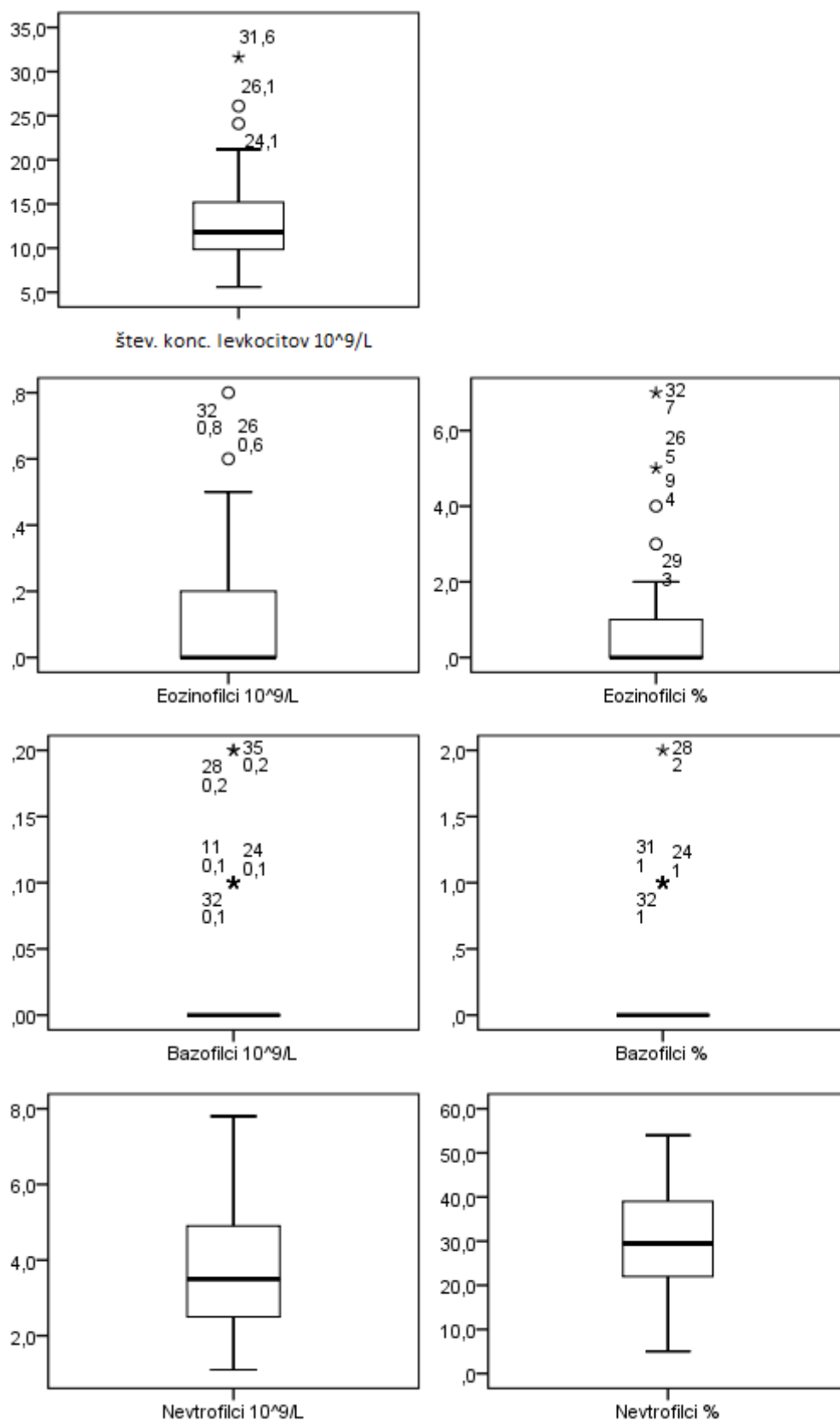
Priloga 4: Referenčne vrednosti trombocitne krvne slike

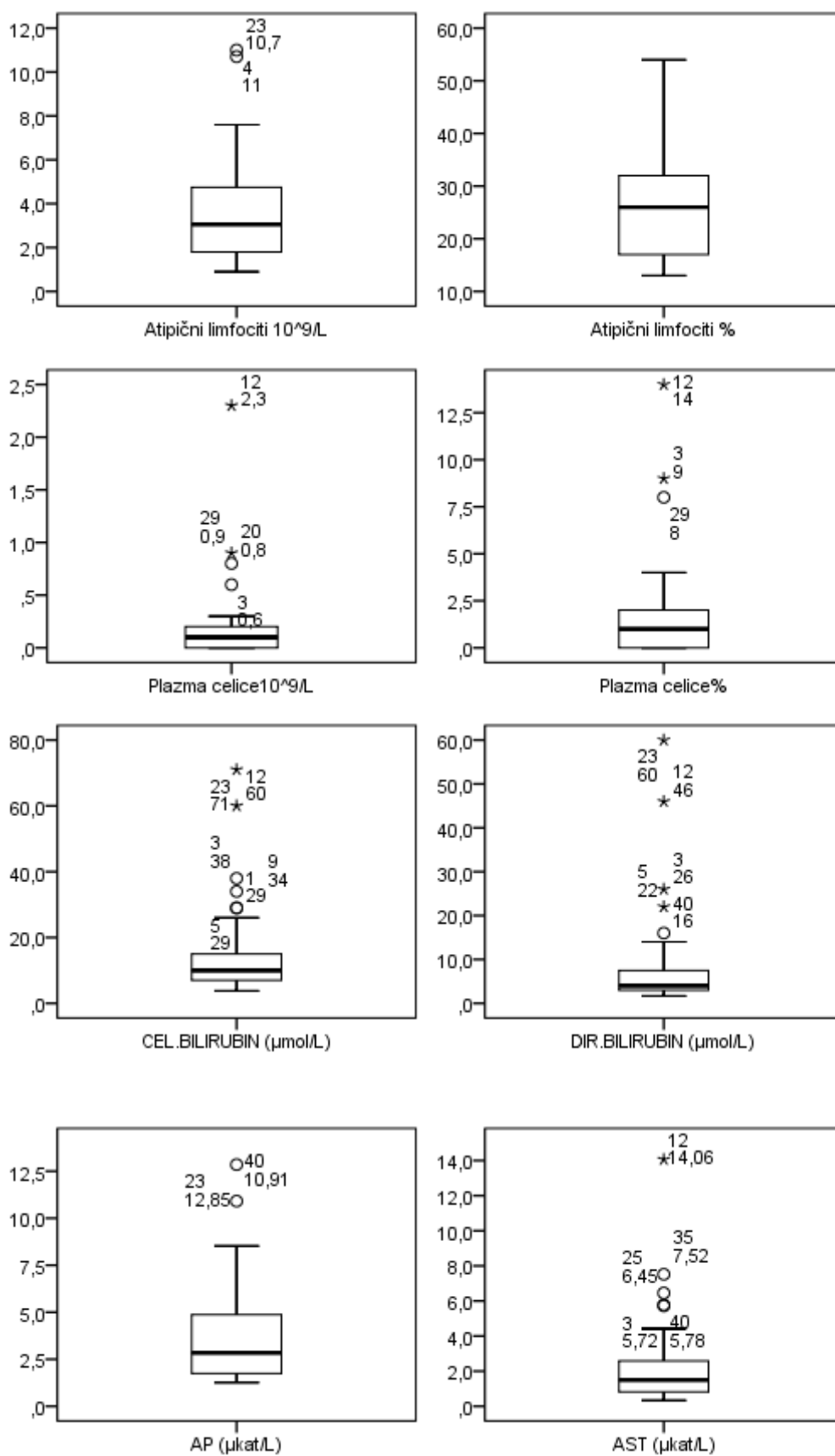
Trombocitna krvna slika	Vrednosti
številčna koncentracija trombocitov	$140\text{--}340 \times 10^9/\text{L}$

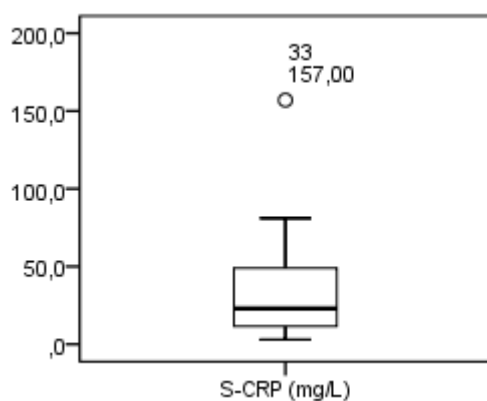
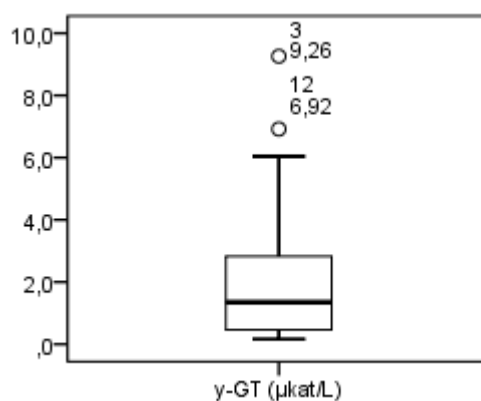
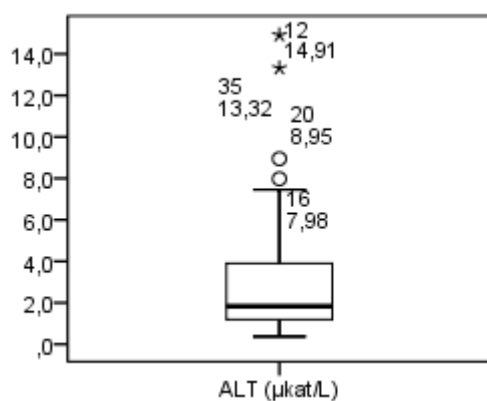
Priloga 5: Referenčne vrednosti biokemičnih markerjev IM [33]

Biokemični markerji	Vrednosti
koncentracija celokupnega bilirubina	Do 17 $\mu\text{mol/L}$
koncentracija direktnega bilirubina	Do 5 $\mu\text{mol/L}$
katalitična aktivnost AP	Moški: 0,67–2,15 $\mu\text{kat/L}$ Ženske: 0,58–1,74 $\mu\text{kat/L}$
katalitična aktivnost ALT	Moški: Do 0,74 $\mu\text{kat/L}$ Ženske: Do 0,56 $\mu\text{kat/L}$
katalitična aktivnost AST	Moški: Do 0,58 $\mu\text{kat/L}$ Ženske: Do 0,52 $\mu\text{kat/L}$
katalitična aktivnost GGT	Moški: Do 0,92 $\mu\text{kat/L}$ Ženske: Do 0,63 $\mu\text{kat/L}$
Koncentracija serumskega CRP	Pod 5 mg/L

Priloga 6: Kvartilni diagrami: pregled razpršenosti podatkov pri posameznih parametrih







Priloga 7: Korelacija med posameznimi parametri 1/2

			št.konc.lev kocitov %	Limfociti 10 ⁹ /L	Limfociti %	Monociti 10 ⁹ /L	Monociti %	Eozinofilci 10 ⁹ /L	Eozinofilci %	Bazofilci 10 ⁹ /L	Bazofilci %	Nevtrofilci 10 ⁹ /L	Nevtrofilci %
Spearman's rho	št.konc.levko citov %	ro	1	,658(**)	-0,031	0,281	-0,288	0,06	-0,023	-0,121	-0,145	,582(**)	-,385(*)
		p		0,000	0,865	0,113	0,104	0,74	0,898	0,502	0,42	0,000	0,027
	Limfociti 10 ⁹ /L	ro	,658(**)	1	,646(**)	0,041	-,385(*)	0,23	0,157	0,035	0,016	-0,019	-,754(**)
		p	0,000		0,000	0,819	0,027	0,198	0,383	0,847	0,93	0,917	0,000
	Limfociti %	ro	-0,031	,646(**)	1	-0,298	-0,331	0,293	0,258	0,25	0,24	-,581(**)	-,657(**)
		p	0,865	0,000		0,093	0,06	0,098	0,147	0,16	0,179	0,000	0,000
	Monociti 10 ⁹ /L	ro	0,281	0,041	-0,298	1	,792(**)	-0,288	-0,249	-0,265	-0,249	,465(**)	0,083
		p	0,113	0,819	0,093		0,000	0,104	0,163	0,136	0,163	0,006	0,646
	Monociti %	ro	-0,288	-,385(*)	-0,331	,792(**)	1	-0,282	-0,203	-0,195	-0,175	0,108	0,333
		p	0,104	0,027	0,06	0,000		0,112	0,256	0,276	0,329	0,55	0,058
	Eozinofilci 10 ⁹ /L	ro	0,06	0,23	0,293	-0,288	-0,282	1	,984(**)	,370(*)	,361(*)	-0,261	-0,331
		p	0,74	0,198	0,098	0,104	0,112		0,000	0,034	0,039	0,142	0,06
	Eozinofilci %	ro	-0,023	0,157	0,258	-0,249	-0,203	,984(**)	1	,377(*)	,376(*)	-0,292	-0,283
		p	0,898	0,383	0,147	0,163	0,256	0		0,031	0,031	0,099	0,111
	Bazofilci 10 ⁹ /L	ro	-0,121	0,035	0,25	-0,265	-0,195	,370(*)	,377(*)	1	,997(**)	-0,18	-0,124
		p	0,502	0,847	0,16	0,136	0,276	0,034	0,031		0,000	0,315	0,491
	Bazofilci %	ro	-0,145	0,016	0,24	-0,249	-0,175	,361(*)	,376(*)	,997(**)	1	-0,197	-0,122
		p	0,42	0,93	0,179	0,163	0,329	0,039	0,031	0,000		0,273	0,5
	Nevtrofilci 10 ⁹ /L	ro	,582(**)	-0,019	-,581(**)	,465(**)	0,108	-0,261	-0,292	-0,18	-0,197	1	,458(**)
		p	0,000	0,917	0,000	0,006	0,55	0,142	0,099	0,315	0,273		0,007
	Nevtrofilci %	ro	-,385(*)	-,754(**)	-,657(**)	0,083	0,333	-0,331	-0,283	-0,124	-0,122	,458(**)	1

		p	0,027	0,000	0,000	0,646	0,058	0,06	0,111	0,491	0,5	0,007	,
	Atipični limfociti 10 ⁹ /L	ro	,881(**)	,545(**)	-0,12	0,129	-,359(*)	0,013	-0,057	-0,048	-0,061	,436(*)	-,479(**)
		p	0,000	0,001	0,505	0,474	0,04	0,942	0,752	0,792	0,736	0,011	0,005
	Atipični limfociti %	ro	,586(**)	0,21	-0,301	-0,02	-0,325	-0,058	-0,092	0,01	0,011	0,26	-,366(*)
		p	0,000	0,24	0,088	0,912	0,065	0,75	0,61	0,954	0,952	0,144	0,036
	Plazma celice 10 ⁹ /L	ro	0,034	-0,302	-,439(*)	0,192	0,218	-0,329	-,354(*)	-0,205	-0,195	0,175	0,227
		p	0,851	0,088	0,011	0,285	0,224	0,062	0,043	0,253	0,277	0,331	0,205
	Plazma celice %	ro	-0,092	-0,333	-,371(*)	0,11	0,195	-0,323	-,349(*)	-0,182	-0,171	0,086	0,269
		p	0,612	0,058	0,034	0,543	0,277	0,067	0,047	0,311	0,34	0,635	0,13
	CEL.BILIRUBIN (μmol/L)	ro	0,321	0,226	0,006	0,131	-0,081	0,111	0,054	0,166	0,157	0,194	-0,261
		p	0,069	0,206	0,976	0,466	0,656	0,539	0,765	0,355	0,382	0,28	0,143
	DIR.BILIRUBIN (μmol/L)	ro	,385(*)	0,278	0,071	0,162	-0,079	0,203	0,144	0,186	0,177	0,177	-0,334
		p	0,027	0,118	0,695	0,368	0,663	0,258	0,423	0,3	0,326	0,324	0,057
	AP (μkat/L)	ro	0,122	0,191	0,265	-0,026	-0,055	,350(*)	0,338	0,163	0,158	-0,166	-,351(*)
		p	0,5	0,287	0,136	0,887	0,763	0,046	0,055	0,366	0,38	0,356	0,045
	AST (μkat/L)	ro	0,135	0,19	0,269	-0,243	-0,21	0,223	0,149	0,176	0,156	-0,289	-,445(**)
		p	0,453	0,29	0,13	0,173	0,24	0,213	0,408	0,328	0,385	0,103	0,01
	ALT (μkat/L)	ro	0,136	0,195	0,262	-0,276	-0,228	0,252	0,177	0,176	0,157	-0,305	-,449(**)
		p	0,451	0,277	0,14	0,12	0,202	0,157	0,323	0,327	0,384	0,085	0,009
	γ-GT (μkat/L)	ro	0,158	0,249	0,307	-0,046	-0,069	0,253	0,193	0,086	0,068	-0,13	-0,335
		p	0,378	0,162	0,082	0,801	0,701	0,155	0,281	0,634	0,705	0,472	0,057
	S-CRP (mg/L)	ro	-0,181	-0,271	-0,234	0,307	,379(*)	-0,304	-0,305	-0,232	-0,239	0,252	,507(**)
		p	0,322	0,133	0,197	0,088	0,032	0,09	0,089	0,201	0,189	0,165	0,003

Priloga 7: Korelacija med posameznimi parametri 2/2

			št.konc.lev kocitov %	Limfociti 10 ⁹ /L	Limfociti %	Monociti 10 ⁹ /L	Monociti %	Eozinofilci 10 ⁹ /L	Eozinofilci %	Bazofilci 10 ⁹ /L	Bazofilci %	Nevtrofilci 10 ⁹ /L	Nevtrofilci %
Spearman's rho	št.levkocitov %	ro	,881(**)	,586(**)	0,034	-0,092	0,321	,385(*)	0,122	0,135	0,136	0,158	-0,181
		p	0,000	0,000	0,851	0,612	0,069	0,027	0,5	0,453	0,451	0,378	0,322
	Limfociti 10 ⁹ /L	ro	,545(**)	0,21	-0,302	-0,333	0,226	0,278	0,191	0,19	0,195	0,249	-0,271
		p	0,001	0,24	0,088	0,058	0,206	0,118	0,287	0,29	0,277	0,162	0,133
	Limfociti %	ro	-0,12	-0,301	-,439(*)	-,371(*)	0,006	0,071	0,265	0,269	0,262	0,307	-0,234
		p	0,505	0,088	0,011	0,034	0,976	0,695	0,136	0,13	0,14	0,082	0,197
	Monociti 10 ⁹ /L	ro	0,129	-0,02	0,192	0,11	0,131	0,162	-0,026	-0,243	-0,276	-0,046	0,307
		p	0,474	0,912	0,285	0,543	0,466	0,368	0,887	0,173	0,12	0,801	0,088
	Monociti %	ro	-,359(*)	-0,325	0,218	0,195	-0,081	-0,079	-0,055	-0,21	-0,228	-0,069	,379(*)
		p	0,04	0,065	0,224	0,277	0,656	0,663	0,763	0,24	0,202	0,701	0,032
	Eozinofilci 10 ⁹ /L	ro	0,013	-0,058	-0,329	-0,323	0,111	0,203	,350(*)	0,223	0,252	0,253	-0,304
		p	0,942	0,75	0,062	0,067	0,539	0,258	0,046	0,213	0,157	0,155	0,09
	Eozinofilci %	ro	-0,057	-0,092	-,354(*)	-,349(*)	0,054	0,144	0,338	0,149	0,177	0,193	-0,305
		p	0,752	0,61	0,043	0,047	0,765	0,423	0,055	0,408	0,323	0,281	0,089
	Bazofilci 10 ⁹ /L	ro	-0,048	0,01	-0,205	-0,182	0,166	0,186	0,163	0,176	0,176	0,086	-0,232
		p	0,792	0,954	0,253	0,311	0,355	0,3	0,366	0,328	0,327	0,634	0,201
	Bazofilci %	ro	-0,061	0,011	-0,195	-0,171	0,157	0,177	0,158	0,156	0,157	0,068	-0,239
		p	0,736	0,952	0,277	0,34	0,382	0,326	0,38	0,385	0,384	0,705	0,189
	Nevtrofilci 10 ⁹ /L	ro	,436(*)	0,26	0,175	0,086	0,194	0,177	-0,166	-0,289	-0,305	-0,13	0,252
		p	0,011	0,144	0,331	0,635	0,28	0,324	0,356	0,103	0,085	0,472	0,165
	Nevtrofilci %	ro	-,479(**)	-,366(*)	0,227	0,269	-0,261	-0,334	-,351(*)	-,445(**)	-,449(**)	-0,335	,507(**)

	p	0,005	0,036	0,205	0,13	0,143	0,057	0,045	0,01	0,009	0,057	0,003
Atipični limfociti 10 ⁹ /L	ro	1	,876(**)	0,013	-0,121	,384(*)	,422(*)	0,132	0,232	0,258	0,152	-,387(*)
	p	,	0,000	0,941	0,502	0,027	0,014	0,464	0,193	0,147	0,4	0,029
Atipični limfociti %	ro	,876(**)	1	0,129	0,006	0,3	0,311	0,111	0,282	0,317	0,098	-,505(**)
	p	0,000	,	0,475	0,972	0,09	0,078	0,538	0,111	0,072	0,586	0,003
Plazma celice 10 ⁹ /L	ro	0,013	0,129	1	,964(**)	0,061	0,037	-0,16	0,085	0,046	-0,039	0,204
	p	0,941	0,475	,	0,000	0,735	0,839	0,374	0,637	0,801	0,829	0,264
Plazma celice %	ro	-0,121	0,006	,964(**)	1	0,021	-0,019	-0,185	0,04	-0,017	-0,041	0,281
	p	0,502	0,972	0,000	,	0,906	0,915	0,302	0,827	0,923	0,821	0,119
CEL.BILIRUBIN (μmol/L)	ro	,384(*)	0,3	0,061	0,021	1	,956(**)	0,169	,384(*)	,391(*)	,500(**)	-0,089
	p	0,027	0,09	0,735	0,906	,	0,000	0,347	0,027	0,024	0,003	0,629
DIR.BILIRUBIN (μmol/L)	ro	,422(*)	0,311	0,037	-0,019	,956(**)	1	0,302	,453(**)	,446(**)	,611(**)	-0,147
	p	0,014	0,078	0,839	0,915	0,000	,	0,087	0,008	0,009	0,000	0,421
AP (μkat/L)	ro	0,132	0,111	-0,16	-0,185	0,169	0,302	1	,638(**)	,636(**)	,747(**)	-0,304
	p	0,464	0,538	0,374	0,302	0,347	0,087	,	0,000	0,000	0,000	0,091
AST (μkat/L)	ro	0,232	0,282	0,085	0,04	,384(*)	,453(**)	,638(**)	1	,960(**)	,795(**)	-,522(**)
	p	0,193	0,111	0,637	0,827	0,027	0,008	0,000	,	0,000	0,000	0,002
ALT (μkat/L)	ro	0,258	0,317	0,046	-0,017	,391(*)	,446(**)	,636(**)	,960(**)	1	,777(**)	-,515(**)
	p	0,147	0,072	0,801	0,923	0,024	0,009	0,000	0,000	,	0,000	0,003
γ-GT (μkat/L)	ro	0,152	0,098	-0,039	-0,041	,500(**)	,611(**)	,747(**)	,795(**)	,777(**)	1	-0,23
	p	0,4	0,586	0,829	0,821	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	,	0,206
S-CRP (mg/L)	ro	-,387(*)	-,505(**)	0,204	0,281	-0,089	-0,147	-0,304	-,522(**)	-,515(**)	-0,23	1
	p	0,029	0,003	0,264	0,119	0,629	0,421	0,091	0,002	0,003	0,206	,

* Korelacija je signifikantna pri $p \leq 0.05$ (2-stransko).

** Korelacija je signifikantna pri $p \leq 0.01$ (2-stransko).

