

Д-р Анелия Гоцева,¹ г-р Десислава Велчева²

¹ СБАЛИПБ „Проф. Ив. Киров“ ЕАД, София

² МДЛ „Цибалаб“ ЕООД

Диагностика и клиничен спектър на инфекции, причинени от EBV

Резюме

Epstein-Barr вирусната инфекция се свързва с развитието на различни човешки болести, включващи острите EBV инфекции, назофарингеалния карцином, лимфома на Бъркит, болестта на Ходжкин, някои Т-клетъчни лимфоми, след-трансплантационни лимфопролиферативни болести, а напоследък и с някои форми рак на стомаха и синдрома на хронична умора. Инфекциозната мононуклеоза е много често срещано заболяване, причинено от EBV.

Ключови думи: EBV инфекция, свързани с EBV болести, тестове за откриване на EBV

Diagnostic and clinical spectrum of infections caused by EBV

Anelia Gotzeva,¹ Desislava Velcheva²

¹ SHIPD „Prof. Ivan Kirov“, Sofia

² MDL „CibaLab“

Abstract

Epstein-Barr virus infection has been associated with the development of variety of human diseases, including acute EBV- infections, nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, some T- cells lymphomas, post- transplant lymphoproliferative disease and more recently, certain cancers of stomach and chronic fatigue syndrome. Infectious mononucleosis a very common illness caused by the EBV.

Key words: Epstein-Barr virus infections, EBV-associated diseases, tests for EBV detection

Въведение

Epstein-Barr virus (EBV, HHV4) е един от най-широко разпространените човешки вируси. Представлява лимфотропен вирус с двуйноверижен ДНК геном (dsDNA). Принадлежи към сем. Herpesviridae, подсем. Gammapherpesvirinae. Характеризира се с наличие на няколко антигена: капсиден – VCA (virale capsid antigen), ранен – EA (early antigen) и нуклеарен – EBNA. Негови рецептори са CD21 върху В-клетъчната повърхност, както и върху орофарингеалния епител. EBV може да трансформира В-лимфоцитите, поради което е с клинично значим онкогенен потенциал.

Два типа EBV, обозначаваани като EBV-1 и EBV-2, инфектират човешката популация. Между тях има голямо сходство, което не се отнася само до регионите, кодиращи Epstein-Barr вирусните нуклеарни антигени (EBNA) и вирусната ранна РНК-аза (EBER). EBV-2 трансформира В-лимфоцитите по-слабо в сравнение с EBV-1. Инфекцията с EBV-2 и коинфекцията с двата типа вируси на Epstein-Barr е по-често срещана в имунокомпрометирани донори, отколкото в общата човешка популация.

Причините за характерните белези на EBV инфекция и асоциираните с нея болести се търсят в геномната структура на вируса и в специфичните особености на вирусната инфекция с нейното въздействие върху имунната система и с имунния отговор на организма.

Днес се приема за установена връзката между EBV и някои малигнени и немалигнени заболявания. В Европа най-честата клинична изява на първичната EBV инфекция е инфекциозната мононуклеоза. В Африка и страните от Далечния Изток предизвиква лимфом на Бъркит и назофарингеален карцином. При HIV-позитивни лица дава вилозна левкоплакия и В-клетъчен лимфом.

Патогенеза и имунологични характеристики

В-лимфоцитите, които са EBV таргетни клетки, още в началото на първичната инфекция биват инфектирани и изпълняват ролята на резервоар на вируса, където той персистира в латентно състояние. По-късно може да настъпи реактивация, обикновено в условията

на имунен дефицит, която по-често е безсимптомна, но е налице вирусна екскреция чрез слюнката. Най-честият механизъм на предаване на EBV е чрез експозиция на инфектирана слюнка от асимптомни индивиди.

Повечето инфектирани с EBV В-лимфоцити биват бързо разрушавани при наличие на интактна имунна система. Малка остатъчна популация от оцелели В-лимфоцити може да стане причина за персистиране на вируса в организма. Т-лимфоцитният клетъчен отговор е от съществено значение при определяне на клиничната експресия на EBV инфекцията. При имунокомпетентни лица имунологичният контрол се осъществява от CD4, CD8 и NK клетки. Бързият и ефективен клетъчен отговор води до контролиране на първичната EBV инфекция и доживотна супресия на вируса. Неефективният Т-клетъчен отговор може да доведе до ексцесивна и неконтролируема В-клетъчна пролиферация.

Имунният отговор на организма е различен при остра и латентна фаза на инфекцията. При остра или активна инфекция преобладава литичната репликация на вируса. EBV DNA се „разплита“ в линейна структура, готова за репликация и започва транскрипция на повече от 100 гена. При латентна (персистираща) инфекция вирусният геном съществува като циркулиращ плазмид, имащ ограничена генна експресия. При латентно протичащата инфекция EBV чрез т. нар. „stealth“ механизми може да избягва имунния отговор на организма и да предизвиква сложни промени в имунитета. Развитието на неоплазми и лимфопрولیферативни заболявания, свързани с EBV, се асоциира с латентна инфекция и латентна генна експресия. Основните гени с латентна генна функция (по Baumforth и сътр.) са:

- EBNA-1 кодира ДНК-свързващ протеин, важен за вирусната репликация в инфектираната клетка. EBNA-1 се експресира при латентна инфекция и е необходим за нарастване на латентността, включен е в патогенезата на различни неоплазми, свързани с EBV, вкл. лимфома на Бъркит.

- EBNA-2 е с доказана роля в растежните трансформации.

- LMP-1 (латентен мембранен протеин) е интегрален мембранен протеин, чиято експресия предизвиква много от промените, свързани с EBV инфекция, протектира В-клетките от апоптоза чрез индуциране на антиапоптотични протеини, също така предизвиква продукцията на IL-10 и IL-6.

- Epstein-Barr ранните РНК-ази (EBER1 и EBER2) се използват като маркери за откриване на латентна EBV инфекция.

Клиничен спектър на EBV инфекции

1. Инфекциозна мононуклеоза („glandular fever“) – най-честата изява на първична инфекция, протича с продължителен фебрилитет, лимфаденопатия, ангина, хепато-

спленомегалия, характерна хемограма с наличие на т. нар. атипични лимфоцити.

2. EBV хепатит – клинична форма на първична инфекция с EBV. Протича най-често като аноктерична форма на остър вирусен хепатит с леко до умерено повишени стойности на серумните трансаминази.

3. X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP или Duncan disease) – рядко вродено имунодефицитно нарушение с ефектен имунен отговор към инфекцията с EBV и много тежко протичаща мононуклеоза.

4. Лимфом на Burkitt – В клетъчен лимфом с висока степен на малигненост и ендемично разпространение в Екваториална Африка и Нова Гвинея.

5. Назофарингеален карцином – недиференциран злокачествен тумор на сквамозния епител на назофаринкса.

6. Болест на Hodgkin – спорадичен лимфом, в ~50% от случаите се доказва EBV DNA в тъканни проби.

7. В-лимфопрولیферативна болест – при посттрансплантационни и HIV-позитивни.

8. Hairy leukoplakia – EBV-индуцирана бенигнена епителна хиперплазия при HIV-позитивни, засяга основно латералния край на езика с образуване на специфичен налет.

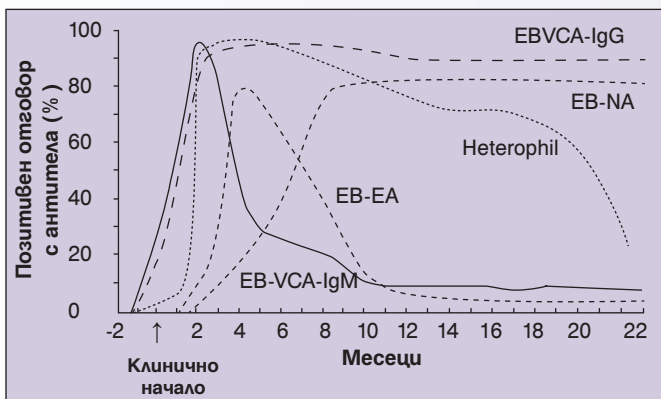
9. Синдром на хроничната умора (CFS) – най-често се свързва с EBV поради откриването на високи титри антитела към EBV. Характеризира се с лесна уморяемост, нарушена памет и концентрация на вниманието, болки в гърлото, лимфаденопатия, главоболие, нарушения в съня в продължение на 6 месеца.

10. Доказана е патогенетичната роля на EBV във възникването на определени морфологични форми на рак на стомаха (недиференциран карцином на кардията), като в Япония EBV-асоциираната форма се среща в 7%, в САЩ в 16% и в Русия в 9%.

Методи за диагностика на EBV инфекции

Диагностиката на инфекцията с EBV обикновено се базира на определяне на серологичния статус и клиничната манифестация. Серологичното изследване се счита за златен стандарт за разграничаване на остра от отминала EBV инфекция при имунокомпетентни пациенти. При имуносупресирани пациенти обаче има инсуфициентен хуморален отговор срещу EBV, поради което серологичното изследване не е надежден маркер за определяне на клиничния статус. При тези пациенти директното детектиране на вирусната нуклеинова киселина е по-подходящо за определяне на клинично значима EBV инфекция. Диагностицирането на EBV инфекцията се извършва посредством:

- Серологични тестове.
- Потвърдителни тестове (блот тестове).
- PCR тестове.
- Биохимични тестове за оценка на чернодробната функция.



Фиг. 1. Динамика на антителата при EBV инфекция

■ Доказване на вирусспецифични антитела към отделните антигени на EBV от клас IgM и IgG:

Anti EA(D) – Early (Diffuse) Antigen – IgM и IgG

Anti VCA (Viral capsid Antigen) IgM и IgG

Anti EBNA1 – Epstein Barr Nuclear Antigen – IgG

■ Количественото определяне на EBV вирусната ДНК се извършва с real time PCR и полученият резултат отразява EBV вирусния товар в копия/ml.

Наличието на EBV VCA IgM е маркер за доказване на остра инфекция. Тези антитела имат пик по време на прехода от ранна към остра фаза на заболяването и изчезват в рамките на 2–3 месеца. Почти едновременно с намаляването на циркулиращите anti EBV VCA

IgM се появяват anti EBV VCA IgG. Те имат пик между 2 и 4 седмици (в периода на остра инфекция), остават да персистират до края на живота и са показателни за имунологичен контакт с EBV под формата на безсимптомна или клинично проявена инфекция. При над 80% от изследваните пациенти със симптоматична инфекциозна мононуклеоза се доказват върхови нива на EBV VCA IgG и EBV VCA IgM още при първото изследване. Антителата към EBNA1 се появяват относително късно – 3 до 6 седмици след началото на заболяването и остават да персистират. Тези антитела могат да липсват при имunosупресирани пациенти (фиг. 1).

Присъствието на EBV VCA IgM и липсата на anti EBNA1 IgG са показателни за първична инфекция.

При съмнение за остра форма на инфекция е препоръчително изследване на следната констелация от маркери: IgM и IgG към VCA, IgM към EA и EBNA антитела.

IgG към ранния антиген (VCA) се появяват в остра фаза и в повечето случаи спадат до неопределими нива след 3 до 6 месеца. Въпреки че детекцията им е показателна за остра инфекция, при 20% от здравите хора могат да се доказват в продължение на години.

Тестът за количествено определяне на EBV DNA в кръв и цереброспинална течност се използва за диагностициране и проследяване на лечението на пациенти с EBV свързани заболявания.

■ Инфекциозна мононуклеоза.

МЕТОДИ	ИЗПОЛЗВАН СУБСТРАТ	ХАРАКТЕРИСТИКА
Серологични методи		
IFA Имунофлуоресцентен метод	Клетъчни линии P3HR-1 и Raji	Класически метод; златен стандарт; висока специфичност; възможност за стадиране на EBV инфекцията с една серумна проба
EIA, ELISA, CLIA (хемилуминисцентен метод)	Лизат от EBV-трансформирани клетъчни линии; EBV лизати; комбинация от лизати и рекомбинантни протеини; рекомбинантни протеини; синтетични пептиди	Бърз, висока чувствителност, подходящ за автоматизация
Blot техники (Western blot u line blot)	Лизат от EBV-трансформирани клетъчни линии; EBV лизати; комбинация от лизати и рекомбинантни протеини	Високо специфичен; използва се основно като потвърдителен метод; възможност за стадиране на EBV инфекцията с една серумна проба
Определяне на IgG авидност чрез IFA, ELISA или Western blot	Титриране на антителата при наличие и отсъствие на урея или други хаотропни реагенти	Специализиран метод, използван за потвърждение на неопределени резултати
Аглутинация на хетерофилни антитела	Raul-Vinnell антигени; говежди еритроцити	Ниска чувствителност, ниска специфичност; 10–50% от децата под 4 години не продуцират хетерофилни антитела
Вирусна изолация	Лимфобластoidни клетъчни линии	Високоспециализиран тест, използван в референтни лаборатории, дълга продължителност (4–8 седмици)
Детекция на нуклеинови киселини		
PCR	Лимфоцити, плазма, серум, цереброспинална течност, тъканни проби	Метод на избор при EBV-асоциирани менингоенцефалити; определяне на вирусния товар при реакцията на инфекцията
In situ хибридизация, in situ PCR	Туморна тъкан	За детектиране на EBV-асоциирани тумори
Вирусни антигени, имунохистохимия и имуноцитология	Туморна тъкан	За детектиране на EBV-асоциирани тумори

Табл. 1. Методи за детекция на EBV

■ EBV-хепатит – нивата на EBV ДНК в периферната кръв през острата фаза на заболяването са много високи и спадат паралелно с отзвучаване на клиничните симптоми.

■ При трансплантирани с висок риск от развитие на посттрансплантационна лимфолиферативна болест (ПТЛБ) – при деца и силно имunosупресирани пациенти, изследването на EBV в кръвни проби е от съществено значение, тъй като EBV вирусният товар често е повишен дни до месеци преди началото на ПТЛБ, като при започване на ефективна терапия нивата бързо спадат.

■ При пациенти с назофарингеален карцином кръвните нива на EBV почти винаги са завишени, като при тези в напреднала фаза нивата са по-високи в сравнение с останалите с локализирано заболяване. Данните сочат, че скоро след започване на лъчетерапия EBV нивата спадат със средна стойност на полуживот 3.8 дни. Един месец по-късно EBV нивата са под границата на детекция (неопределими) при пациенти, които са в ремисия, докато при пациенти с релапс на болестта EBV ДНК нивата са все още завишени.

Схематично методите за диагностициране на EBV инфекцията са представени в табл. 1.

Заклучение

През 1964 г. Epstein описва първия човешки туморен вирус, откривайки негови частици в лимфома на Burkitt. Henle открива взаимовръзката между инфекциозната мононуклеоза и EBV вируса през 1968 г. Понастоящем е установена връзката на EBV вируса с редица заболявания при човека.

Epstein-Barr вирусът е убикватерен. Повече от 90% от възрастните имат серологични доказателства за предшестваща EBV-инфекция. При децата е по-висока честотата на първична инфекция в сравнение с възрастните, при които доминира реактивация на EBV, като последната рядко дава клинична симптоматика. Острата EBV е с пик в детска и млада възраст.

Диагностиката на EBV инфекции се основава на клиничната изява на заболяването и серологичния профил с доказване на специфични антители спрямо антигенни вирусни компоненти, които се експресират в различните стадии на инфекция.

Литература

1. Божков Б. EBV инфекция и връзката и с някои болести при човека. Медицински преглед, 2000.
2. Brooks LA, Crook T, Crawford DH: Epstein-Barr virus and lymphomas. In: infections and Human Cancer. Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press 1999; 98–123.
3. Cohen JI: Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; 343:481.
4. Epstein-Barr virus, p. 2575–2627. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, and B. Roizman (ed.), Fields virology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. stein-Barr virus – recent advances. *Lancet Infect Dis* 3:131–140.
5. Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn* 2001 Dec; 6(4):279–89.
6. Gärtner, B. C., J. M. Fischinger, K. Roemer, M. Mak, B. Fleurent, and N. Mueller-Lantzsch. 3. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J Virol Methods* 2001; 93:89–96.
7. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001 Feb; 3(1):1–10.
8. Holmes, R. D., and R. J. Sokol. Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2002; 6:456–464.
9. Kozic S, Vince A, Bes JI, Rode OD, Lepej SZ, Poljak M, Bozic M, Kessler HH. Evaluation of a commercial real-time PCR assay for quantitation of Epstein-Barr virus DNA in different groups of patients. *J Virol Methods* 2006 Aug; 135(2):263–8.
10. Macsween, K. F., and D. H. Crawford. 2003. Ep Rickinson, A. B., and E. Kieff. 2001.
11. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. *Journal of Clin Microbiol* 2004 August; 42(8):3381–3387.
12. Stevens SJ, Pronk I, Middeldorp JM. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen. *J Clin Microbiol* 2001 Apr; 39(4):1211–6.