



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Diagnostické vyšetření viru Epstein-Barrové v běžné  
laboratorní praxi**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: [SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ](#)

**Autor:** Lenka Miléřová

**Vedoucí práce:** MVDr. Michaela Verčinská

České Budějovice 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Diagnostické vyšetření viru Epstein-Barrové v běžné laboratorní praxi“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 4. 5. 2021

.....

Lenka Milěřová

### **Poděkování**

Děkuji své vedoucí bakalářské práce paní MVDr. Michaelle Verčinské za cenné rady, čas a trpělivost. Děkuji i celému týmu sekce Infekční sérologie a imunologie Laboratoře Brno, Modřice, Evropská 873, jehož všichni členové mi byli nápomocni při praktickém zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a partnerovi za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

# **Diagnostické vyšetření viru Epstein–Barrové v běžné laboratorní praxi**

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o viru Epstein-Barrové (EBV) se zaměřením na metody jeho sérologického průkazu v praktické části. Cílem práce bylo vyhodnotit výsledky laboratorních testů provedených v roce 2019 a vztáhnout je k četnosti výskytu jednotlivých stádií infekce EBV v populaci. Šíření viru v populaci je obrazem socializace a životních standardů lidí. Výsledky ukazují, že zejména u předškolních dětí se první setkání s virem posouvá až do okamžiku nástupu do školy. Současně se zvyšuje podíl negativních testů. To však přináší riziko, že se infekce bude projevovat čím dál častěji s těžším průběhem.

## **Klíčová slova**

EBV; virus Epstein-Barrové; VCA; EBNA; EA; CLIA; infekční mononukleóza

# **Diagnostic examination of Epstein-Barr virus in routine laboratory practice**

## **Abstract**

This Bachelor's thesis summarizes the existing knowledge about the Epstein-Barr virus (EBV). In practical part it focuses on the methods of its serological detection. This thesis evaluates the results of laboratory tests and relates them to the frequency of occurrence of EBV infection in the population. The spread of the virus among people copies the degree of their socialization and living standards. The results show that children encounter the virus at school rather than at preschool age for the first time. At the same time, the number of negative tests increases. However, this carries the higher risk of more severe course of the infection.

## **Key words**

EBV; Epstein-Barr virus; VCA; EBNA; EA; CLIA; infectious mononucleosis

## Obsah

ÚVOD.....	8
1 TEORETICKÝ PŘEHLED.....	9
1.1 HISTORIE.....	9
1.2 VIRION.....	11
1.2.1 Morfologie a struktura virionu.....	11
1.2.2 Antigenní výbava.....	12
1.3 EPIDEMIOLOGIE.....	13
1.4 PATOGENEZE.....	13
1.5 DIAGNOSTIKA.....	14
1.5.1 Klinický obraz.....	14
1.5.2 Další onemocnění spojovaná s EBV.....	15
1.5.3 Laboratorní diagnostika.....	16
1.6 LÉČBA.....	17
2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	19
3 METODIKA.....	20
3.1 Úvod ke sběru dat.....	20
3.2 Přístrojové vybavení.....	20
3.3 Princip metody CLIA.....	21
3.4 Stanovení specifických protilátek proti antigenům EBV.....	22
3.4.1 Princip testu.....	22
3.4.2 Složení kompletních činidel pro jednotlivé testy.....	22
3.4.3 Preanalytická fáze.....	24
3.4.4 Příprava přístroje.....	27
3.5 Vlastní analýza vzorků.....	28
3.5.1 Interpretace výsledků.....	28
4 VÝSLEDKY.....	31
4.1 Četnost výskytu jednotlivých stádií EBV infekce v roce 2019.....	31
4.2 Četnost primoinfekcí v závislosti na věku a pohlaví v roce 2019.....	32
4.3 Četnost primoinfekcí v průběhu roku 2019.....	33
4.4 Četnost negativních výsledků dle věku.....	34
4.5 Promořenost testovaného vzorku.....	34
4.6 Porovnání četnosti primoinfekcí v roce 2019 a 2020 dle věku.....	35
4.7 Četnost primoinfekcí v roce 2020 dle jednotlivých kalendářních měsíců.....	36

5	DISKUZE .....	37
6	ZÁVĚR.....	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	40
8	OBRÁZKY.....	43
9	SEZNAM ZKRATEK.....	44

## ÚVOD

Virus Epstein-Barrové (EBV) se řadí ke skupině herpesvirů, konkrétně ke čtvrté skupině herpesvirů HSV4 (Votava, 2003). EBV je všudypřítomný. Krejsek (2016) uvádí, že je mu exponovaná celá lidská populace. Jeho objev má přesto dlouhou historii.

EBV napadá epitelové buňky orofaryngu a následně i B buňky přítomné ve sliznici. Inkubační doba se pohybuje mezi 4 až 7 týdny. V raném dětském věku probíhá infekce asymptomaticky. V pozdějších letech se projevuje nejčastěji pod obrazem infekční mononukleózy. EBV může vést i k malignitám. U Afrických dětí je původcem maligního Burkittova nádoru. U imunokompromitovaných jedinců se po transplantaci téměř u 10 % zejména dětských příjemců vyskytují B-buněčné lymfomy. V Jihovýchodní Asii je s EBV spojován výskyt nasofaryngeálního karcinomu (Goering et al., 2016). EBV je spojován i s některými autoimunitními chorobami, typicky u roztroušené sklerózy. Rolf (2017) uvádí, že u pacientů s roztroušenou sklerózou byly u všech jedinců prokázány protilátky proti EBV infekci.

V laboratorní diagnostice je dnes zlatým standardem sérologický průkaz protilátek proti specifickým bílkovinám EBV vysoce citlivou metodou založenou na nepřímé chemiluminiscenční imunoanalýze (CLIA). Samotné vyšetření protilátek proti EBV však pro stanovení diagnózy samo o sobě nestačí. Vždy je nutné ho doplnit o diagnózu klinickou (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Předkládaná práce má na základě sběru dat výše zmíněnou sérologickou metodou doplnit údaje o expozici lidské populace viru EBV. Hodnoceny byly vzorky přijaté v roce 2019, u nichž bylo ordinováno vyšetření na EBV protilátky. Tyto jsou navíc porovnány se vzorky z roku 2020, kde se předpokládá vliv pandemie SARS-CoV-2 v důsledku snížení kontaktu mezi lidmi, zejména dětí ve školách.



# 1 TEORETICKÝ PŘEHLED

## 1.1 HISTORIE

Počátek historie viru Epstein–Barrové (EBV) sahá do osmdesátých let devatenáctého století. Tehdy ruský pediatr Nil Filatov popsal onemocnění projevující se celkovou únavou, horečkou, bolestí v hrdle, otokem mízních uzlin a pojmenoval ho jako syndrom idiopatické adenitidy. Později v roce 1989 popsal obdobné případy německý lékař Emil Pfeiffer pod názvem žlázová horečka (Ambrožová, 2005; Hoffmann, 2006; Balfour, 2016).

V roce 1920 lékaři Thomas Spurt a Frank Evans z Univerzity Johnse Hopkinse v Marylandu odebrali vzorky krve šesti studentům s příznaky žlázové horečky a studovali je pod mikroskopem. Všimli si většího počtu neobvykle velkých lymfocytů, z toho důvodu nové onemocnění přejmenovali na infekční mononukleózu (IM). Tyto lymfocyty podrobněji popsali lékaři z Minnesotské univerzity Hal Downey a C. A. McKinlay na vzorku krve studenta, u něhož se předpokládal rozvoj akutní leukémie. Downey věřil, že změněné lymfocyty byly benigní, a v roce 1923 zveřejnil popis tří typů atypických lymfocytů, jejichž větší výskyt v krevním nátěru se stal novým standardem laboratorní diagnostiky IM. Atypické lymfocyty pojmenoval svým jménem jako Downeyho buňky (Hoffmann, 2006; Balfour 2016; Feder a Rezuke, 2020).

Další pokrok v diagnostice IM znamenal roku 1932 objev heterofilních protilátek v krvi pacientů s IM. Američtí lékaři John Rodman Paul a Walls Willard Bunnel si všimli neobvyklé reakce vyvolané smícháním krve pacientů s krví jiného živočišného druhu, v tomto případě ovce, kozy nebo koně. Pod mikroskopem pozorovali velké shluky krvinek, které pohromadě držely přítomností heterofilních protilátek. Paul–Bunnelův test se dodnes v některých případech využívá k diagnostice IM. (Hoffmann, 2006; Fingerroth, 2016; Balfour 2016).

Objev dosud neznámé příčiny vzniku IM započal koncem padesátých let minulého století dětský chirurg Denis Burkitt. Ten byl během druhé světové války odvelen do africké Ugandy, kde i poté působil na Makerere univerzitě a zdokonaloval své chirurgické dovednosti. V roce 1957 Burkitt vyšetřoval pětiletého chlapce s masivním nádorem čelisti. S měsíčním odstupem pozoroval dívku s podobným tumorem. Nádor se rychle zvětšoval, každých 24 až 48 hodin se zdvojnásobil. Obě děti nakonec zemřely.

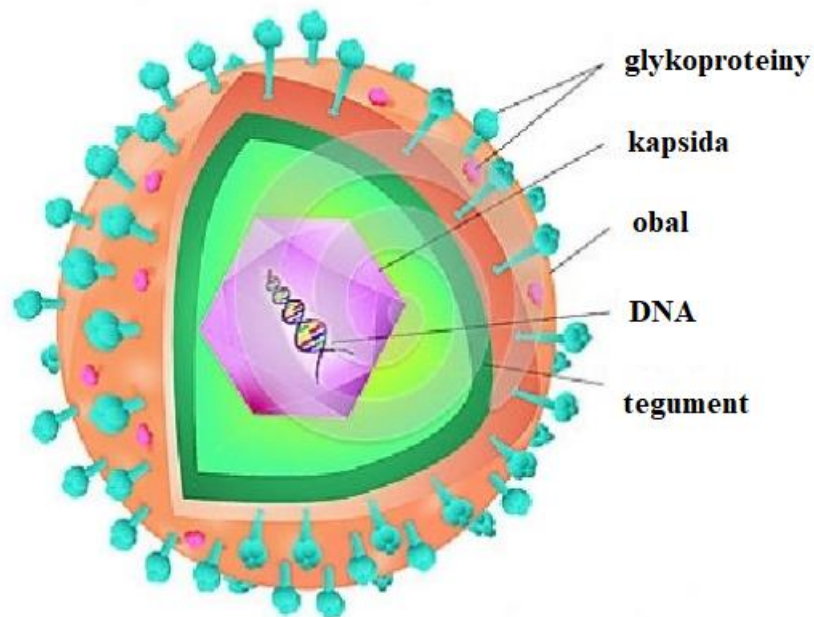
Brzy na to měl možnost se setkat s překvapivě velkým množstvím podobných případů. Vypozoroval, že výskyt nádoru je častější u dětí ve věku šesti až osmi let. U dětí starších čtrnácti let se vyskytuje vzácně a nebyl pozorován jediný případ u dětí do jednoho roku. Své bádání rozšiřoval cestami napříč celou Afrikou. Došel k závěru, že výskyt nemoci závisí na přírodních sezónních podmínkách. Tumor se vyskytoval v nadmořských výškách do 1800 m s ročními srážkami většími než 60 cm a průměrnou teplotou nad 16 °C. Stejně podmínky odpovídají nemocem přenášeným hmyzem. Burkitt se proto domníval, že hmyz hraje svůj podíl na vzniku nádoru (Henles a Lennette, 1979; Balfour, 2006; Esau, 2017).

Své poznatky Burkitt roku 1961 přednášel ve Spojeném království v nemocnici Middlesex. Zde byl v publiku fascinován virolog Anthony Epstein myšlenkou, že by do etiologie Burkittova lymfomu mohl být zapojen biologický činitel. Podařilo se mu následně získat vzorek a tento analyzoval pomocí elektronového mikroskopu. V roce 1964 zveřejnili Anthony Epstein se svým týmem tvořeným Bertem Achongem a studentkou Yvonne Barrovou zprávu o objevu virových částic v lymfoblastech izolovaných z pacientů s Burkittovým lymfomem, nápadně podobných herpes virům (Henles a Lennette, 1979; Fingerroth, 2016; Balfour, 2016; Esau, 2017).

Že se jedná o dosud neznámý typ herpes viru, prokázal koncem šedesátých let manželský pár Gertrudy a Wenera Henleových. Henleovi svými studiiemi potvrdili přítomnost EBV u pacientů s BL, ale i u zdravých lidí. Domnívali se tedy, že EBV způsobuje i jiná onemocnění s mírnějšími příznaky. Ke zjištění, o která onemocnění šlo, jim dopomohla náhodná událost. Henleovi rovněž testovali krev svých spolupracovníků. Téměř u všech zjistili přítomnost protilátek proti EBV. Jediná, u níž se protilátky neprokázaly, byla devatenáctiletá laborantka Elaine Hutkinová. Její krev tak Henleovi použili pro pokusy k přenosu EBV z buněk BL na zdravé B lymfocyty. V průběhu studie Elaine onemocněla infekční mononukleózou. Když po uzdravení znovu darovala krev, všichni byli fascinováni, protože Elaininy B lymfocyty byly infikované EBV a v krvi byly přítomné protilátky. Tento objev započal řadu studií, které konečně potvrdily podíl EBV na vzniku infekční mononukleózy (Hoffmann, 2006; Levy, 2007; Esau, 2017).

## 1.2 VIRION

Kapitola popisuje morfologii a strukturu virové částice. Antigenní výbava je omezena na antigeny podstatné především pro sérologickou diagnostiku.



**Obrázek 1:** Herpes virus. Zdroj: <https://slidetodoc.com/human-herpes-viruses-1-dr-d-kalita-associate>

### 1.2.1 Morfologie a struktura virionu

Virion o průměru 120–200 nm tvoří čtyři kompartmenty. Asi polovinu průměru zaujímá ikosaedrální bílkovinná kapsida složená ze 150 šestihranných a 12 pětihranných dutých kapsomer. Z vnější strany kapsidu obklopuje nerovnoměrně rozložený amorfní materiál zvaný tegument přecházející ve dvouvrstevný lipidový obal. Obal pochází z vnitřního listu jaderné membrány hostitelské buňky a procházejí jím obalové glykoproteiny. Centrálně je uložený elektronopticky hutný nukleoid (dřeň), který vytváří vláknitou kostru pro navinutí lineární dvouvláknové deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Konce vláken DNA jsou ukotveny z vnitřní strany ke kapsidě (Kouba et al., 1988; Greenwood, 1999; Votava et al., 2003, Krejsek et al., 2016).

Virová DNA obsahuje kolem 186 párů kilobází a kóduje zhruba 80 proteinů (Greenwood, 1999). Většina z nich se funkčně uplatňuje v rámci genové exprese. Jen zhruba třetinu představují strukturální bílkoviny. U některých genů se předpokládá jejich původ v lidském genetickém materiálu a jejich využití pro únik z dohledu imunitního systému (Greenwood, 1999; Votava, 2003; Krejsek et al., 2016).

### **1.2.2 Antigenní výbava**

Jak již bylo řečeno dříve, antigenní výbava je jedním z rozlišovacích znaků jednotlivých herpesvirů (Goering, 2016). Podkapitola shrnuje nejvýznamnější z nich.

#### **Virový kapsidový antigen VCA (Viral Capsid Antigen)**

Jako první byl objevený antigen virové kapsidy (Kouba et al., 1988). Jedná se o komplex strukturních bílkovin. Je součástí kapsidy a je nezbytný pro existenci viru (Kouba, 1988; VIDIA, 2017).

#### **Časný antigen EA (Early Antigen)**

EA představuje nestrukturální proteinový komplex syntetizovaný v časně fázi cyklu virové replikace. Funkčně se jedná především o enzymy katalyzující tvorbu produktů pro jednotlivé části virionu a regulační peptidy. EA je nezbytný pro správnou replikaci virové DNA. Podle struktury a lokalizace v hostitelských buňkách se rozlišují dvě komponenty antigenu. Difuzní komponenta EA(D) je rozptýlená v cytoplazmě a jádru buňky. Tvorba protilátek proti EA(D) je typická u pacientů v akutní fázi onemocnění IM a u pacientů s anaplastickým karcinomem nosohltanu, zejména pokud jsou rozsáhle postižené lymfatické uzliny. Naproti tomuto pacientů s BL mají v séru protilátky proti druhé komponentě EA(R) (restricted). EA(R) se omezuje pouze na ostře ohraničené úseky cytoplazmy (VIDIA, 2017). K rozlišení obou komponent se v praxi využívá senzitivity komponenty EA(D) k metanolu (Kouba et al., 1988; VIDIA, 2017).

#### **Jaderný antigen EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen)**

EBNA reprezentuje rodinu šesti nestrukturálních jaderných bílkovin exprimovaných v latentně infikovaných buňkách. EBNA-1 udržuje cirkulární stav virové DNA, zprostředkovává její replikaci současně s dělením hostitelské buňky. EBNA-2 je nezbytný pro transformaci B lymfocytů v tzv. buňky lymfoblastoidní linie, buňky s potenciálem se nekonečně dělit. Souvisí tedy se vznikem a udržením malignit (Kouba et al., 1988; Clerici a De Paschale, 2012; Kang a Kieff, 2015; VIDIA, 2017).

## **Glykoprotein gp350/220**

Glykoprotein 350/220 je nejvíce exprimovaným proteinem na povrchu virové částice. Je nezbytný pro adhezi virové částice k hostitelské buňce a následný průnik do jejího nitra (Greenwood, 1999; Balfour, 2016).

### ***1.3 EPIDEMIOLOGIE***

EBV je pro člověka významným původcem virových infekcí (Goering et al., 2016). Dle Krejska et al. (2016) je mu exponovaná celá lidská populace. Husa et al. (2019) uvádějí promořenost populace mezi 90–95 %.

Z člověka na člověka se virus přenáší především slinami, zřídka může dojít k přenosu pohlavním stykem nebo krevní transfúzí. V rozvojových zemích dochází k infekci již v raném dětství a tyto infekce jsou většinou bezpříznakové. Hlavním důvodem je ještě nemálo vyzrálý imunitní systém. V rozvinutých zemích se s ohledem na vysoké životní standardy, zejména vysokou úroveň sanitace, posouvá primoinfekce do vyššího věku, často však za cenu těžšího průběhu. Největší nárůst infekcí se ve vyspělých zemích objevuje nejčastěji mezi 1–6 a 14–20 lety (Goering et al., 2016; Krejssek et al., 2016).

Inkubační doba je 4–7 týdnů (Havlík, 2002).

### ***1.4 PATOGENEZE***

Podmínkou průniku EBV do buňky je přítomnost buněčného receptoru C3d (CD21), který za normálních okolností váže složku komplementu C3. To dělá z člověka téměř výhradního hostitele. EBV k receptoru přilne prostřednictvím svého obalového glykoproteinu gp350/220 (Votava, 2003; Goering, 2016).

Virus nejdříve infikuje epitelové buňky orofaryngu. Po skončení lytického cyklu se buňka rozpadá a virus se šíří do okolí. Napadá další buňky včetně B lymfocytů přítomných ve sliznici. B lymfocyty také prodělávají lytickou fázi, při níž výrazně exprimují virové antigeny, které se stávají terčem imunitního systému hostitele (Krejssek et al, 2016).

Jako první reagují na infikované B lymfocyty přirození zabíječi (NK-buňky) a pomahačské CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. Později dochází k aktivaci cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, kteří se snaží infikované B lymfocyty zlikvidovat. V důsledku této snahy

potlačit virovou infekci se na krevním nátěru objevují jako atypické lymfocyty, velké CD8<sup>+</sup> T lymfocyty s bazofilní cytoplazmou a excentricky uloženým jádrem (Beneš, 2009; Smíšková, 2012; Goering et al., 2016; Krejsek et al., 2016).

Některé B lymfocyty v průběhu infekce ztrácí virové antigeny, tím uniknou imunitnímu dohledu a přechází do fáze latence. Tyto buňky se dostávají do cirkulace, šíří se dále do těla, zejména do lymfatických uzlin, sleziny a jater. Masivní lymfocytární infiltrace v těchto tkáních může vést k jejich mechanickému poškození. (Votava, 2003; Krejsek et al. 2016).

Za určitých okolností, zejména při současném oslabení organismu, může dojít k reaktivaci latentních B lymfocytů. Reaktivace zpravidla probíhá bezpříznakově. Svědčí pro ni znovuobjevení sérových protilátek proti některým antigenům (Havlík et al., 2002; Beneš, 2009; Krejsek et al., 2016).

Některé B lymfocyty se mohou vrátit do epitelu orofaryngu, přejít do lytické fáze a znovu napadat okolní buňky nebo se šířit do slin a jejím prostřednictvím na jiného hostitele (Krejsek et al., 2016).

Část B lymfocytů se může transformovat v nesmrtelné buňky. To může při nedostatečné imunitní odpovědi vést k malignímu onemocnění (Beneš, 2009).

K obcházení imunitního systému využívá EBV i produkci falešného interleukinu IL-10. Tím EBV působí proti apoptóze infikovaných buněk. Zároveň tvoří působky proti složkám komplement (Goering et al., 2016).

## ***1.5 DIAGNOSTIKA***

Diagnostika EBV infekcí se opírá zejména o klinický obraz a přítomnost specifických protilátek proti EBV v séru pacienta (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

### ***1.5.1 Klinický obraz***

Klinické projevy jsou výsledkem imunitní odpovědi hostitelského organismu, zejména produkce cytokinů. Velmi malé děti přechází infekci zpravidla bez příznaků. U starších jedinců se infekce často projevuje pod obrazem **infekční mononukleózy**. Inkubační doba EBV infekce se pohybuje mezi 4–7 týdny. Poté se objevuje horečka, únava, bolesti v hrdle, často jsou patrné petechie na tvrdém patře (Holzelovo znamení) nebo

otoky kolem očí (Basseho znamení). Bývají postižené lymfatické uzliny, zejména jsou nejvíce zduřelé uzliny na krku. Nápadné bývá zvětšení tonsil doprovázené souvislými bělavými povlaky (Roháčová, 2005; Smíšková 2012; Goering et al., 2016).

V 90 % se objevuje postižení jater s mírným zvýšením hepatocelulárních enzymů. Může být zvětšená slezina. V nepatrném množství může být infekce komplikovaná aseptickou meningitidou, encefalitidou, obstrukcí orofaryngu či rupturou sleziny. Ta může mít fatální následky (Smíšková, 2012; Goering et al 2016).

Dle Havlíka (2002) mohou za obrazem infekční mononukleózy stát asi ve 20 % případů jiné etiologické agens, zejména cytomegalovirus (v 10 % případů), případně i adenoviry, toxoplazmóza a další.

### ***1.5.2 Další onemocnění spojovaná s EBV***

EBV je spojovaný s celou řadou dalších onemocnění. Ve většině případů je spolupůsobícím faktorem oslabení imunitního systému.

### **Lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozomu (XLP)**

Onemocnění je podmíněno dědičnou mutací genu pro signální molekulu SLAM, která ovlivňuje spolupráci T a B lymfocytů. Imunitní systém v důsledku toho není schopen eliminovat infikované B lymfocyty. Masivní proliferace T lymfocytů vede k poškození jater. Hrozí těžký průběh IM a tvorba lymfomů. Jedinou možnou prevencí je transplantace kostní dřeně (Smíšková, 2012; Goering et al. 2016).

### **Burkittův lymfom**

Burkittův lymfom je typický zejména pro některé oblasti Afriky. Rozvíjí se zejména u dětí, jejichž imunitní systém je oslabený malárií (Smíšková, 2012).

### **Nazofaryngeální karcinom**

Tento typ karcinomu je typický zejména v jižní Číně a jihovýchodní Asii. Tumor je dlouho asymptomatický, než se projeví metastatickým postižením krčních uzlin (Smíšková, 2012).

## **Potransplantační lymfoproliferativní nemoc (PTLD)**

Rozvíjí se nejčastěji v dětském věku za přispění imunosupresivní terapie. Může se projevit pod obrazem těžké IM nebo v podobě malignit. Lepší prognózu vykazují pacienti, u nichž došlo vlivem imunosuprese k reaktivaci EBV infekce oproti těm, kteří se s EBV setkají poprvé (Goering et al, 2016).

## **Roztroušená skleróza**

EBV hraje významnou roli v rozvoji autoimunitních onemocnění, jako například roztroušené sklerózy (Jarasch, 2019). Rolf (2017) ve svém článku uvádí, že pacienti s roztroušenou sklerózou vykazují séropozitivitu EBV protilátek u 100 % případů.

Předpokládá se i jeho vliv při vzniku **chronického únavového syndromu**.

### ***1.5.3 Laboratorní diagnostika***

Stěžejní metodou laboratorního průkazu EBV infekce je stanovení **specifických protilátek** proti virovým antigenům VCA, EBNA a EA, zejména jejich dynamické změny v průběhu infekce (DiaSorin: Metodický list LIAISON® EBV IgM, 2020).

Pro akutní infekci je typická pozitivita VCA IgM, která setrvává 4–8 týdnů. Proti nim postupně stoupají VCA IgG. Protilátky proti EA se objevují zhruba 3–4 týdny od prvních příznaků a setrvávají v krvi až 4 měsíce. Protilátky proti EBNA značí stádium latence. EBNA IgG společně s VCA IgG zůstávají prokazatelné po celý život. Pro reaktivaci infekce svědčí pozitivní VCA IgG, protilátek EA a EBNA (Smíšková 2012). Zmiňované vztahy popisuje tabulka 5 v praktické části této práce.

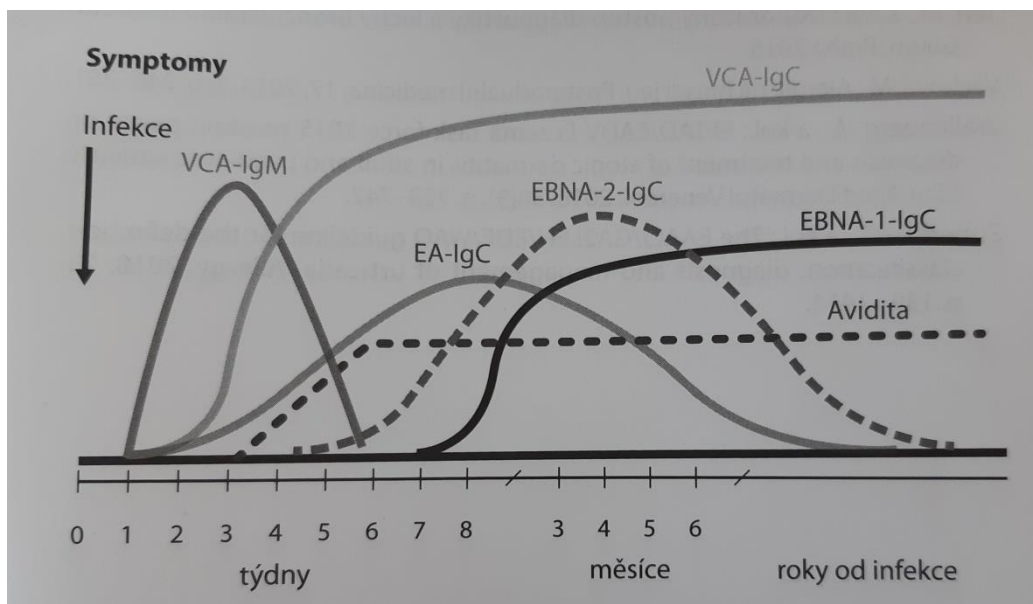
Mnohdy může být přínosem doplnění dalších laboratorních vyšetření, zejména krevního obrazu, který prokáže lymfocytózu, nebo krevního nátěru s atypickými lymfocyty. Často dochází ke zvýšenému uvolňování jaterních transamináz (Smíšková, 2012; Goering, 2016).

Průkaz heterofilních protilátek reakcí s koňskými (IM-test) nebo ovčími erytrocyty (Paul Bunnelova reakce) nebo hovězími (OCH test, Ericsonův test) se vedle novodobých sérologických vyšetření dostává do pozadí. Jedním z důvodů je i skutečnost, že u dětí do pěti let se asi v 50 % případů heterofilní protilátky netvoří (Roháčová, 2005; Votava, 2010).



V indikovaných případech se využívá přímý průkaz kvantifikací EBV DNA prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR) (Smíšková, 2012).

Dynamiku protilátek proti jednotlivým složkám znázorňuje obrázek 2 (obr. 2).



**Obrázek 2:** Graf dynamiky protilátek proti jednotlivým složkám EBV.

Zdroj: Bartůňková a Panzner, 2019.

## 1.6 LÉČBA

Léčba IM je zpravidla symptomatická. U imunokompetentních jedinců většinou dochází do 2–3 týdnů ke spontánnímu uzdravení a antivirotická léčba není nutná (Roháčová, 2005; Goering et al., 2016).

Při podezření na bakteriální anginu se přistupuje k podání antibiotik. V tomto případě je nutné myslet na kontraindikaci antibiotik na bázi aminopenicilinu, která způsobují u infekcí EBV těžký toxoalergický exantém (Roháčová, 2005).

U imunosuprimovaných pacientů zatím proběhlo několik studií s využitím antivirotik či monoklonálních protilátek proti receptoru CD20 infikovaných B lymfocytů mířících proti replikaci EBV. Jejich účinky se však projeví jen v lytické fázi životního cyklu EBV (Goering et al., 2016).

Němečtí vědci pracují na výzkumu vakcíny využívající prázdné virové částice. Tyto neobsahují DNA, a nejsou tudíž infekční. Virové částice obsahují desítky proteinů

lytické fáze, ale žádné proteiny latentní fáze. Následně do částic včlenili imunogenní proteiny tvořené proteiny latentní fáze a proteiny tegumentu. Účinnost byla testována v izolovaných systémech a u živých zvířat. Prokázalo se, že tyto částice dokáží vyvolat vhodnou imunologickou odpověď (Jarasch, 2019).

## 2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

### **Cíle:**

1. Shrnutí dosavadních poznatků o viru Epstein–Barrové s důrazem na standardní metody laboratorní diagnostiky.
2. Posouzení promořenosti testovaného souboru.
3. Porovnání výsledků z roku 2019 a 2020 za účelem zjištění možných vlivů aktuální pandemie SARS-CoV-2.

### **Hypotézy:**

- H<sub>1</sub>** Nepromořenost dospělých v rámci testovaného souboru odpovídá 5–10 %.
- H<sub>2</sub>** Zvyšuje se věk pro primární infekci k 20. roku života.
- H<sub>3</sub>** V roce 2020 je statisticky významný pokles primoinfekcí korelující s restričními opatřeními proti šíření SARS-CoV-2.

## 3 METODIKA

### 3.1 Úvod ke sběru dat

Veškeré výsledky uvedené v mé bakalářské práci, testované vzorky a přístrojové vybavení pro praktickou část mi poskytla Laboratoř Brno, synlab czech, s. r. o., Evrospká 873 v Modřicích.

Pro statistickou analýzu dat byl zvolen testovaný soubor lidí, u nichž bylo v průběhu roku 2019 ordinováno vyšetření na specifické protilátky proti viru Epstein-Barrové. Výsledky z roku 2020 mohly zkreslit dosavadní trend z důvodu šířící se pandemie SARS-CoV-2, proto nejsou z hlediska promořenosti testované populace virem EBV uvažovány.

Z výsledků testů naměřených prakticky v období června až srpna 2020, doplněných o zbývající výsledky z celého roku 2020, byl vytvořen nový soubor lidí pro porovnání četnosti primoinfekcí v obou zmíněných letech, a to v závislosti na věku a kalendářním měsíci.

### 3.2 Přístrojové vybavení

Vzorky byly testovány pomocí plně automatického analyzátoru LIAISON<sup>®</sup>XL, který pracuje na principu nepřímé chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA) (SOP T.BM 10: Obsluha, údržba, kalibrace a interní hodnocení kvality na analyzátoru LIAISON XL, 2019).

Analyzátor se ovládá přes dotykovou obrazovku počítače. Vzorky se vkládají do stojánku a v něm následně do kolejnic 1–10 v prostoru pro vkládání stojánků. Napravo od něj je umístěný chlazený prostor pro reagentie. Vzorky i reagentie nesou unikátní čárový kód, který přístroj rozpozná pomocí laserové čtečky. Pipetování zajišťují dva robotické pipetory, jeden pro vzorky s adaptérem pro jednorázové plastové pipety, druhý s ocelovou jehlou pro reagentie. Nádoby na kapaliny a odpadní nádoby jsou uzavřené pod analyzátozem. Vpravo v blízkosti chlazeného prostoru pro reagentie je umístěné magnetické zařízení, které napomáhá rozptýlení magnetických mikročástic před vložením kompletního činidla (integrálu) do analyzátoru. Magnetické mikročástice musí být pro správnou funkci integrálu zcela resuspendovány (SOP T.BM 10 Obsluha, údržba, kalibrace a interní hodnocení kvality na analyzátoru LIAISON XL, 2019).

Jednotlivé součásti analyzátoru popisuje následující obrázek (obr. 3)



**Obrázek 3:** Přístroj LIAISON® XL, Laboratoř Brno synlab czech, s. r. o., Modřice  
(Zdroj: Vlastní)

Další materiály pro analýzu vzorků zahrnují kyvety LIAISON® XL, jednorázové špičky LIAISON® XL, soupravu startovacích reagentií LIAISON® XL Starter Kit, promývací kapalinu LIAISON® XL, vaky na odpad LIAISON® XL, systémovou kapalinu (destilovaná voda) (SOP T.BM 10 Obsluha, údržba, kalibrace a interní hodnocení kvality na analyzátoru LIAISON XL, 2019).

### 3.3 Princip metody CLIA

CLIA využívá k detekci protilátek emisi viditelného záření (luminiscenci), které je generované přechodem elektronu z vyššího energetického (excitovaného) stavu do stavu základního. Nadbytek energie se přechodem do základního stavu uvolní ve formě světla. Jako zdroj energie pro vybuzení elektronu slouží chemická reakce (Cinquanta et al., 2017).

Rozlišuje se CLIA přímá pomocí luminiforových markerů, nebo nepřímá pomocí enzymových markerů s vhodným substrátem, který pro svou aktivaci potřebuje chemické nebo enzymatické reakce spojené s imunologickou reakcí. Přidáním zesilovače se zvyšuje aktivace elektronu. To vede k vysoké citlivosti (Cinquanta et al., 2017).

Využití automatizovaných analytických platform přináší imunochemické reakce na pevné fázi s výrazně kratší dobou provedení (30–40 minut). Vysoká stabilita činidel a

konjugátů podstatným způsobem přispívá k prodloužení stability kalibrační křivky až na několik týdnů (Cinquanta et al., 2017).

### ***3.4 Stanovení specifických protilátek proti antigenům EBV***

V praxi se pro diagnostiku infekce EBV vyšetřují specifické protilátky proti virovému kapsidovému antigenu VCA v třídách IgM a IgG, časnému difúznímu antigenu EA(D) v třídě IgG a nukleárnímu antigenu EBNA-1 v třídě IgG. Princip testu je u všech shodný. Jednotlivé testy se liší složením reagensů dodávaných ve formě kompletních činidel (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

#### ***3.4.1 Princip testu***

Příslušný antigen je navázaný na magnetických částicích (pevná fáze). Během první inkubace se protilátky v testovaném séru naváží na pevnou fázi. V průběhu druhé inkubace reaguje derivát isoluminolu (konjugát isoluminol-protilátka) s protilátkou proti antigenu. Po každé inkubaci dochází k promytí materiálu, aby se eliminovaly nenavázané složky. Startérem se následně indukuje prudká chemiluminiscenční reakce. Světelný signál se měří fotonásobičem v relativních světelných jednotkách (RLU) a je úměrný koncentraci specifických protilátek (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

#### ***3.4.2 Složení kompletních činidel pro jednotlivé testy***

Všechny reagensie jsou dodávané již v pracovním ředění, je tedy možné s nimi hned pracovat. Pořadí reagensů odpovídá uspořádání lahviček v kompletním činidle (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020). Hlavní složky integrálů uvádí následující tabulky (Tabulka 1, Tabulka 2, Tabulka 3, Tabulka 4).

**Tabulka 1: Test LIAISON® EBV IgM**

<b>Reagencie</b>	<b>Označení</b>	<b>Obsah</b>
<b>Magnetické částice</b>	<b>SORB</b>	Magnetické částice potažené antigenem VCA
<b>Kalibrátor 1</b>	<b>CAL 1</b>	Lidské sérum/plazma s nízkým obsahem IgM protilátek proti VCA
<b>Kalibrátor 2</b>	<b>CAL 2</b>	Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami IgM protilátek proti VCA
<b>Pufř A</b>	<b>BUF A</b>	Koží IgG proti lidským IgG (absorpční reagencie pro omezení interference lidských IgG specifickým proti VCA nebo k omezení interference revmatoidního faktoru)
<b>Konjugát</b>	<b>CONJ</b>	Směs myších monoklonálních protilátek proti lidským IgM konjugovaných s derivátem isoluminolu a myších polyklonálních nespecifických protilátek
<b>Počet testů</b>		100

*Zdroj: DiaSorin: Metodický list LIAISON® EBV IgM, 2020*

**Tabulka 2: Test LIAISON® VCA IgG**

<b>Reagencie</b>	<b>Označení</b>	<b>Obsah</b>
<b>Magnetické částice</b>	<b>SORB</b>	Magnetické částice potažené VCA
<b>Kalibrátor 1</b>	<b>CAL 1</b>	Lidské sérum/plazma s nízkým obsahem IgG protilátek proti VCA
<b>Kalibrátor 2</b>	<b>CAL 2</b>	Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami protilátek IgG proti VCA
<b>Roztok k ředění vzorků DIL SPE</b>		
<b>Konjugát</b>	<b>CONJ</b>	Směs myších monoklonálních protilátek proti lidským IgM konjugovaných s derivátem isoluminolu a myších polyklonálních nespecifických protilátek
<b>Počet testů</b>		100

*Zdroj: DiaSorin: Metodický list LIAISON® VCA IgG, 2019*

**Tabulka 3:** Test LIAISON® EBNA IgG

Reagencie	Označení	Obsah
Magnetické částice	<b>SORB</b>	Magnetické částice potažené syntetickým peptidem EBNA-1
<b>Kalibrátor 1</b>	<b>CAL 1</b>	Lidské sérum/plazma s nízkým obsahem IgG protilátek proti EBNA EBV
<b>Kalibrátor 2</b>	<b>CAL 2</b>	Lidské sérum/plazma s vysokým obsahem IgG protilátek proti EBNA EBV
<b>Roztok k ředění vzorků DIL SPE</b>		
<b>Konjugát</b>	<b>CONJ</b>	Směs myších monoklonálních protilátek proti lidským IgM konjugovaných s derivátem isoluminolu a myších polyklonálních nespecifických protilátek
<b>Počet testů</b>		100

*Zdroj: DiaSorin: Metodický list LIAISON® EBNA IgG, 2019*

**Tabulka 4:** Test LIAISON® EA IgG

Reagencie	Označení	Obsah
Magnetické částice	<b>SORB</b>	Magnetické částice potažené rekombinantním polypeptidem EA(D) z E. coli
<b>Kalibrátor 1</b>	<b>CAL 1</b>	Lidské sérum/plazma s nízkým obsahem IgG protilátek proti EA(D) EBV
<b>Kalibrátor 2</b>	<b>CAL 2</b>	Lidské sérum/plazma s vysokým obsahem IgG protilátek proti EA(D) EBV
<b>Roztok k ředění vzorků DIL SPE</b>		
<b>Konjugát</b>	<b>CONJ</b>	Směs myších monoklonálních protilátek proti lidským IgM konjugovaných s derivátem isoluminolu a myších polyklonálních nespecifických protilátek
<b>Počet testů</b>		100

*Zdroj: DiaSorin: Metodický list LIAISON® EA IgG, 2019*

### 3.4.3 Preanalytická fáze

Preanalytická část významně ovlivňuje spolehlivost výsledků vyšetření. Uvádí se, že během ní vzniká 46–68 % chyb, z toho 10–20 % má za následek zhoršení kvality zdravotní péče, 3 % těchto chyb dokonce ohrožuje bezpečí pacienta. (Franeková a Jabor, 2020).

Preanalytickou fází lze rozdělit na část mimolaboratorní a laboratorní. Mimolaboratorní část zahrnuje přípravu pacienta k odběru biologického materiálu, vlastní odběr vzorku,



jeho označení, vyplnění žádanky a transport odebraného vzorku do laboratoře. Laboratorní část zahrnuje kontrolu správnosti odběru materiálu ve vztahu k požadovanému vyšetření, kontrolu správného vyplnění žádanky, přidělení laboratorního čísla, zadání požadavků do laboratorního informačního systému (LIS) a současně laboratorní přípravu vzorku pro vlastní analýzu s následným rozdělením pro jednotlivá pracoviště laboratoře (Šimek, 2019).

### **Odběr a transport vzorku do laboratoře**

K vyšetření se nejčastěji používá sérum odebrané standardním aseptickým způsobem z žíly, nejlépe nalačno. Je možné využít i krevní plazmu s přídavkem antikoagulancií K<sub>3</sub>EDTA, citrátu sodného nebo heparinu (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Zkumavku se vzorkem je nutné označit minimálně jménem pacienta, jeho rodným číslem nebo datem narození. Na žádance k laboratornímu vyšetření je potřeba uvést jméno pacienta, rodné číslo, datum narození, diagnózu, datum a čas odběru, razítko a podpis žádajícího lékaře/oddělení a požadované vyšetření.

Vzorek s žádankou je následně přebírán řidičem a transportován v termotašce nebo přenosné lednici do laboratoře, kde jej přebírají pracovníci příjmu.

### **Příjem vzorku laboratoří**

Pracovníci příjmu kontrolují, zda souhlasí údaje na zkumavce s údaji uvedenými v žádance. Zároveň zkontrolují, zda byl pro dané vyšetření použit vhodný odběrový materiál. Zadáním vzorku do laboratorního informačního systému je mu přiřazen čárový kód s jedinečným číslem, kterým se polepí zkumavka se vzorkem i žádanka.

Následně se zkumavka skenuje do počítače. Software využívaný Laboratoří Brno synlab czech, s. r. o. automaticky vybere zaškrtnutá vyšetření na žádance. Pracovník zkontroluje, případně opraví označená vyšetření a následně uvolní vzorek k dalším úpravám.

### **Centrifugace**

Centrifugace slouží k oddělení krevních buněk od séra působením odstředivé síly. Hnací jednotkou centrifugy je motor, který uvádí do otáčivého pohybu rotor se stojánky pro vkládání zkumavek. Účinnost centrifugace závisí nejen na velikosti odstředivé síly,

ale i na velikosti, tvaru, hmotnosti, hustotě částic i viskozitě prostředí (Cibiček a Vacek, 2014).

Při vkládání zkumavek do centrifugy je třeba dbát na jejich rovnoměrné rozložení, aby nedocházelo k poškození přístroje. Výsledkem je krev rozdělená na sediment krevních elementů na dně zkumavky a sérum nad ním. Sérum se dle potřeb dále rozděluje do zkumavek pro jednotlivá pracoviště laboratoře.

### **Třídění zkumavek pro jednotlivá pracoviště**

Třídění vzorků v Laboratoři Brno synlab czech, s. r. o. významně usnadňují třídící jednotky AutoMate 2500 od firmy Beckman Coulter a OLA2500HS od firmy Olympus.

System rozpozná uzavřenou zkumavku opatřenou čárovým kódem, otevře ji a napipetuje vzorek z primární zkumavky do sekundárních zkumavek (aliquoty). Ty jsou automaticky označeny štítkem s čárovým kódem, který odpovídá kódu původního vzorku. Primární i sekundární zkumavky jsou přesouvány dopravníkovým pásem do vyzvedávací pozice, odkud je robot přenesen do zásobníků, které se následně distribuují na konkrétní pracoviště laboratoře (Beckman Coulter Návod k použití: AutoMate 2500 Family: Verze softwaru 4.1.1, 2013).

Přístroje jsou řízeny Laboratorním informačním systémem. To zajišťuje produkci požadovaného množství aliquotů pro jednotlivá pracoviště dle požadavků žadatele (Beckman Coulter Návod k použití: AutoMate 2500 Family: Verze softwaru 4.1.1, 2013).

### **Uchování vzorku**

Pokud je vzorek vyšetřen do sedmi dní od odběru, uchovává se v lednici při teplotě 2–8 °C. V jiném případě se mrazí při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se musí vzorky dobře promíchat, než se vloží do analyzátoru (DiaSorin: Metodický list LIAISON® EBV IgM, 2020).

### **3.4.4 Příprava přístroje**

#### **Ranní údržba**

Před zahájením sekvence vyšetření je potřeba zkontrolovat hladiny systémových kapalin (vody a promývacího roztoku) v nádobách a hladiny startovacích reagentů. Dále se kontrolují zásoby kyvet a jednorázových špiček v příslušných zásuvkách. Pokud některou komponentu doplňujeme, je potřeba aktualizovat stav v softwaru přístroje. Kontroluje se také naplnění nádob pro tekutý a pevný odpad. V případě potřeby se tyto vyprázdní a dekontaminují (SOP T.BM 10, 2019).

#### **Kontrola kvality**

Každé ráno před zahájením provozu, při výměně kompletního činidla, po kalibraci, nebo pokud se mění šarže startéru, se měří interní kontroly jako prostředek spolehlivosti stanovení. Kontrolní vzorky negativní a pozitivní pro sérové protilátky proti jednotlivým antigenům EBV jsou připraveny v pracovním ředění. Před vložením kontrol do přístroje se ruční čtečkou načtou čárové kódy kontrol z analytického certifikátu, který uvádí rozsah koncentrací každé kontroly (SOP T.BM 10, 2019; DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Hodnoty kontrol musí ležet v očekávaném rozmezí. Pokud jsou hodnoty jedné nebo obou kontrol mimo rozmezí, musí se provést kalibrace a následně měření kontrol opakovat. Pokud i tak leží hodnoty mimo rozmezí, použije se nová lahvička kontroly. Pokud jsou hodnoty mimo rozmezí, výsledky se nesmí stanovit (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

#### **Kalibrace**

Kalibrace umožňuje upravit přiřazenou vzorovou křivku pomocí detekovaných hodnot relativních světelných jednotek RLU (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Kalibraci provádíme, pokud se mění šarže kompletního činidla nebo startovací sady, nebo od poslední kalibrace uběhla delší doba než čtyři týdny, po údržbě analyzátoru, nebo tehdy, pokud jsou kontrolní hodnoty mimo očekávané rozmezí (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Kalibrátor s nízkou i vysokou hladinou protilátek proti příslušnému antigenu jsou součástí kompletního činidla. Hodnoty kalibrátorů se načítají z radiofrekvenčního identifikačního transpondéru (štítku RFID). Kalibraci spouštíme přes software analyzátoru. Po skončení testu je kalibrace samočinně přijata nebo odmítnuta. Tento stav musíme před analýzou vzorků zkontrolovat (DiaSorin: Metodický list LIAISON® EBV IgM, 2020).

### **3.5 Vlastní analýza vzorků**

Veškeré reagensie pro stanovení jednotlivých sérových protilátek proti specifickým bílkovinám proti EBV jsou součástí jednotlivých kompletních činidel.

1. Před vložením kompletního činidla do prostoru pro reagensie je potřeba resuspendovat magnetické částice. K tomu slouží magnetické zařízení umístěné vpravo od prostoru pro reagensie. Kompletní činidlo se stranou s magnetickými částicemi vloží do magnetického zařízení a nechá se asi 30 s resuspendovat.
2. Vložíme kompletní činidlo do analyzátoru do prostoru pro reagensie. Analyzátor načte parametry testu ze štítku a začne sám odečítat 15 minutový interval, při němž pokračuje promíchání reagensií a resuspendace magnetických částic. Dříve nelze test spustit
3. Vzorky pacientů vložíme do stojánku tak, aby čárové kódy na zkumavkách směřovaly doleva a mohly být přečteny čtečkou analyzátoru.
4. Stojánek se vzorky vložíme do prostoru pro vzorky. Dráha, do které je možné stojánek vložit, je označena blikající diodou. Tato po vložení stojánku zhasne.
5. Analyzátor načte kódy vložených vzorků. Přeb dotykovou obrazovku jim přiřadíme příslušné testy a spustíme analýzu.
6. Jakmile analyzátor dokončí analýzu, zobrazí příslušný výsledek.

#### **3.5.1 Interpretace výsledků**

##### **VCA IgM**

Metodický list k testu VCA IgM Dia Sorin (2020) uvádí rozsah testu 10–160 U/mL protilátek proti VCA. Jako negativní se hodnotí vzorky s koncentrací EBV IgM pod 20 U/mL. Jako pozitivní se hodnotí vzorky s koncentrací EBV IgM rovnou nebo vyšší než 40 U/mL. Vzorky s koncentrací EBV IgM v rozmezí 20–40 U/mL hodnotíme jako

nejasné a je vhodné je doplnit o stanovení jiných EBV protilátek, případně o klinickou diagnózu (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

Pokud naměříme výsledek mimo rozsah testu vyšší než 160 U/mL, vyšetřuje se vzorek znovu se zředěním nejčastěji 1:10. Analyzátor vzorek sám naředí dle nastaveného poměru. Výsledek testu tímto poměrem vynásobí, a získaná hodnota tedy odpovídá hladině protilátek nezředěného vzorku (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM, 2020).

### **VCA IgG**

Rozsah testu pro stanovení VCA IgG je 10–750 U/mL protilátek proti VCA. Jako negativní se hodnotí vzorky s koncentrací protilátek VCA IgG nižší než 20 U/mL. Jako pozitivní se hodnotí vzorky s koncentrací protilátek VCA IgG rovnou nebo vyšší než 20 U/mL (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> VCA IgG, 2019).

Pokud analyzátor naměří hodnotu protilátek VCA IgG vyšší než 750 U/mL, ředí se vzorek nejčastěji v poměru 1:20 a vyšetří se znovu. Analyzátor výsledek následně automaticky vynásobí a zobrazí hodnotu protilátek v nezředěném vzorku (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> VCA IgG, 2019).

Samostatný pozitivní výsledek VCA IgG se považuje za nejistý. Doporučuje se vyšetření opakovat za 10 až 14 dní.

### **EBNA IgG**

Rozsah testu je 3–600 U/mL protilátek EBNA IgG. Hodnoty protilátek do 5 U/mL hodnotíme jako negativní. Hodnoty EBNA IgG rovné nebo vyšší než 20 U/mL hodnotíme jako pozitivní. Hodnoty v rozmezí mezi 5 až 20 U/mL považujeme za nejasné a je vhodné výsledek doplnit o výsledky stanovení protilátek proti jiným EBV antigenům a o klinickou diagnózu (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBNA IgG, 2019).

Pokud analyzátor naměří hodnotu protilátek EBNA IgG vyšší než 600 U/mL, ředí se vzorek nejčastěji v poměru 1:20 a vyšetří se znovu. Analyzátor výsledek následně automaticky vynásobí a zobrazí hodnotu protilátek v nezředěném vzorku (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EBNA IgG, 2019).

## EA IgG

Rozsah testu je 5–150 U/ml protilátek EA(D) IgG. Jako negativní se hodnotí koncentrace protilátek EA(D) IgG do 10 U/ml. Jako pozitivní se hodnotí koncentrace protilátek EA(D) IgG rovna nebo vyšší než 40 U/ml. Pokud vyjde výsledek v rozmezí 10–40 U/ml, měl by se hodnotit jako nejasný a mělo by se přistoupit ke stanovení jiných EBV antigenů s přihlédnutím ke klinické diagnóze (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EA IgG, 2019).

Změří-li analyzátor koncentraci protilátek vyšší než je jeho měřitelný rozsah, zředí se testovaný vzorek nejčastěji v poměru 1:10 a test se opakuje. Analyzátor po skončení testu výsledek automaticky vynásobí a výsledná hodnota odpovídá koncentraci protilátek v nezředěném séru (DiaSorin: Metodický list LIAISON<sup>®</sup> EA IgG, 2019).

### Určení fáze infekce

V praxi není možné stanovit fázi infekce na základě jediného výsledku. Vždy se současně hodnotí výsledky testů na protilátky proti několika EBV antigenům. Zároveň je důležité přihlédnout ke klinickému hodnocení.

Následující tabulka uvádí jednotlivé fáze EBV infekce v závislosti na přítomnosti konkrétního typu protilátek proti EBV antigenům (tabulka 5).

**Tabulka 5:** Pozitivita specifických protilátek proti antigenům EBV v jednotlivých fázích infekce

	VCA		EA	EBNA	
	IgM	IgG	IgG	IgM	IgG
<b>Primoinfekce časná</b>	+	-	-	-	-
<b>Primoinfekce pozdní</b>	+	+	+/-	+	-
<b>Rekonvalescence, recentní EBV infekce</b>	+/-	+	+/-	+/-	+
<b>Latentní infekce – anamnestické protilátky</b>	-	+	-	-	+
<b>Reaktivace perzistující infekce</b>	+	+	+	-	+

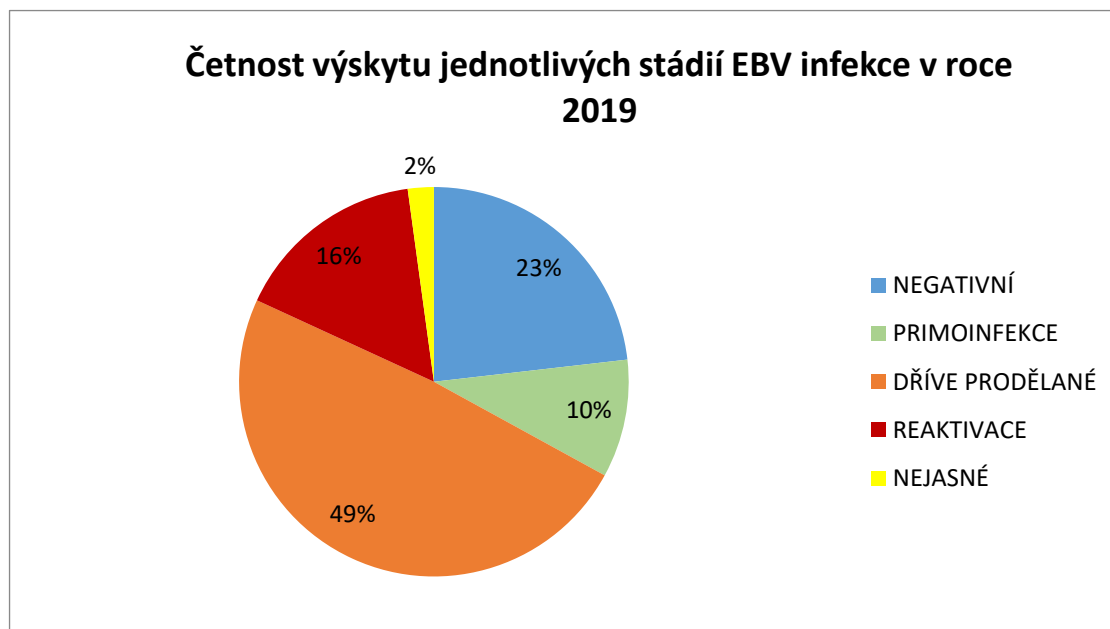
Zdroj: [www.internimedica.cz/pffs/int/2012/O6/06.pdf](http://www.internimedica.cz/pffs/int/2012/O6/06.pdf)

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Četnost výskytu jednotlivých stádií EBV infekce v roce 2019

V roce 2019 bylo v Laboratoři Brno synlab czech s. r. o. v Modřicích ordinováno vyšetření na protilátky proti specifickým bílkovinám EBV, vždy proti VCA (IgM i IgG), EBNA (IgG) a EA(D) IgG současně, u 3899 pacientů.

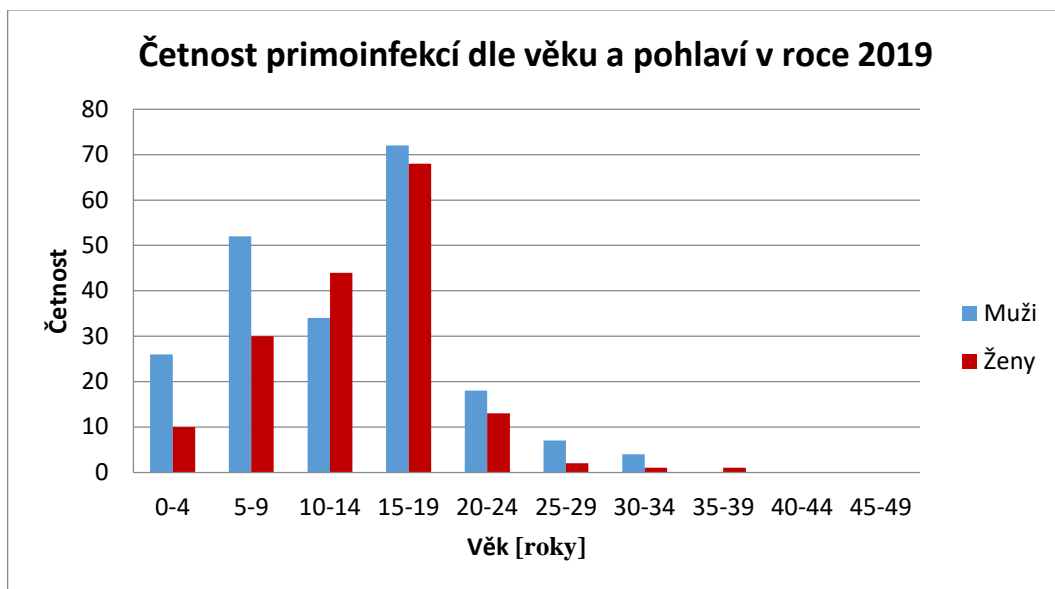
Následující obrázek (obr. 4) ukazuje zastoupení jednotlivých stádií EBV infekce v testovaném vzorku v roce 2019. U 159 (4 %) pacientů byly v séru prokázány pouze pozitivní protilátky proti VCA (IgG). Tento výsledek je obecně brán za nejasný. U pacientů starších 20 let (75 případů, 1,9 %) byly tyto výsledky přiřazeny k četnosti prodělaných infekcí. V případě mladších jedinců (84 jedinců, 2,2 %) je možné, že infekce je ve stadiu nedávno prodělané (do čtyř měsíců) a nemuseli ještě vytvořit protilátky proti EBNA. Je u nich nutné diagnózu došetřit, proto byly z dalšího statistického hodnocení vyřazeny.



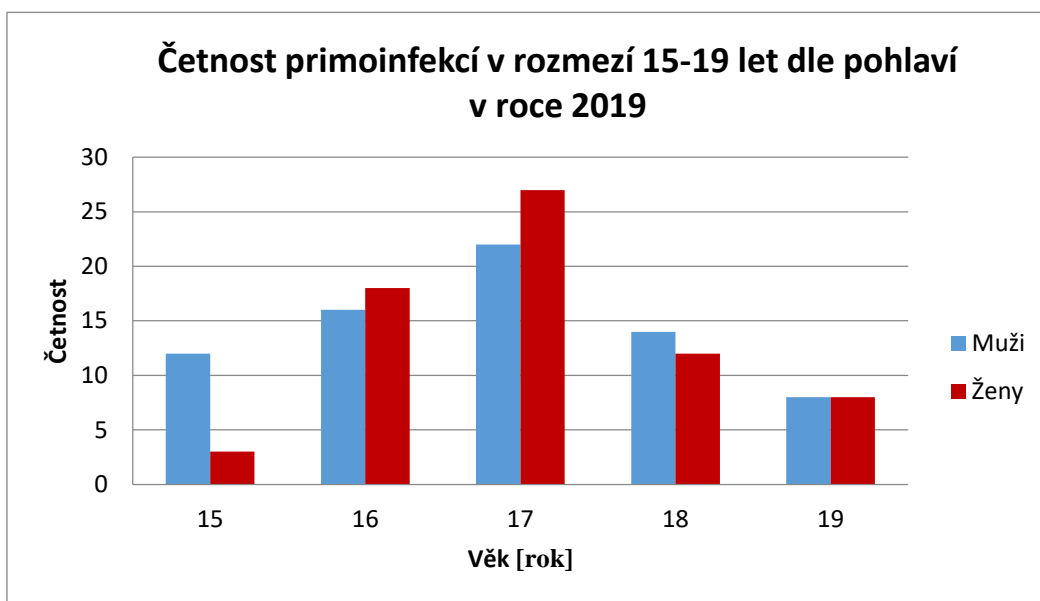
**Obrázek 4:** Četnost výskytu jednotlivých stádií EBV infekce v roce 2019  
(Zdroj: Vlastní)

#### 4.2 Četnost primoinfekcí v závislosti na věku a pohlaví v roce 2019

Z následujících grafů (obr. 5 a obr. 6) je patrný významný nárůst primoinfekcí ve věkové kategorii 15–19 let s maximem v 17 letech. V tomto věku vykazovalo obraz primoinfekce 140 jedinců (37 % všech primoinfekcí), z toho 49 (35 %) bylo ve věku 17 let.



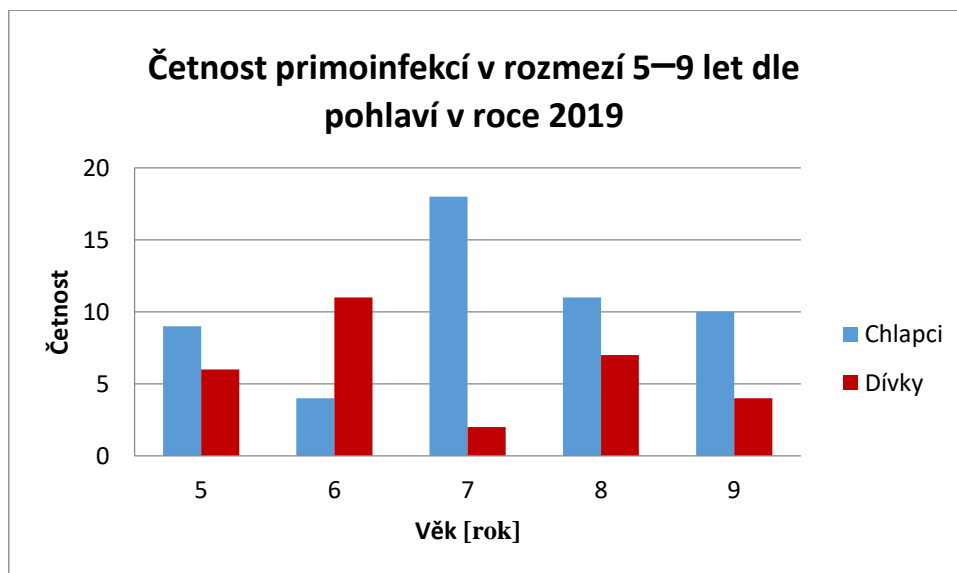
**Obrázek 5:** Četnost primoinfekcí dle věku a pohlaví v roce 2019 (Zdroj: Vlastní)



**Obrázek 6:** Četnost primoinfekcí v rozmezí 15–19 let dle pohlaví v roce 2019 (Zdroj: Vlastní)



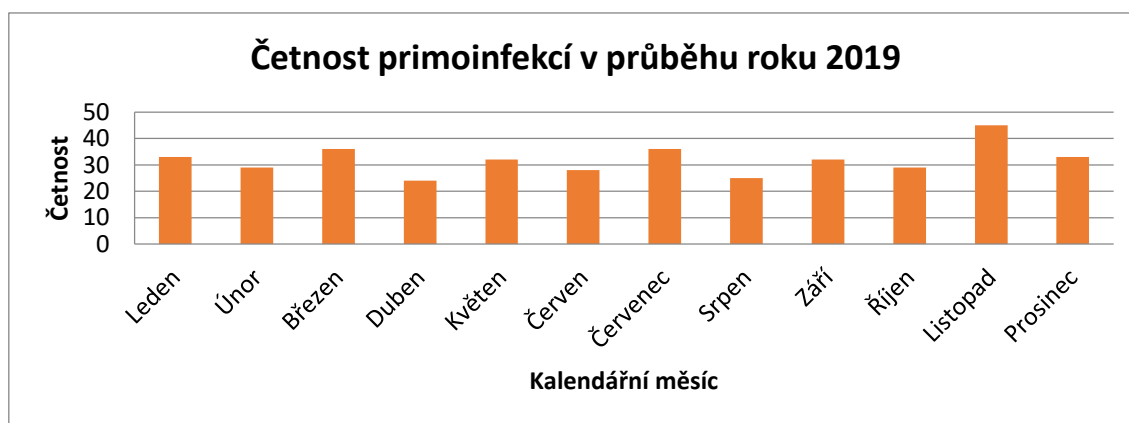
Významný je také nárůst primoinfekcí u chlapců oproti dívkám ve věkové kategorii 5–9 let s maximem v 7 letech v počtu 18 případů (obr. 7). To odpovídá 22 % ze všech primoinfekcí v této věkové kategorii.



**Obrázek 7:** Četnost primoinfekcí v rozmezí 5–9 let dle pohlaví v roce 2019 (Zdroj: Vlastní)

#### 4.3 Četnost primoinfekcí v průběhu roku 2019

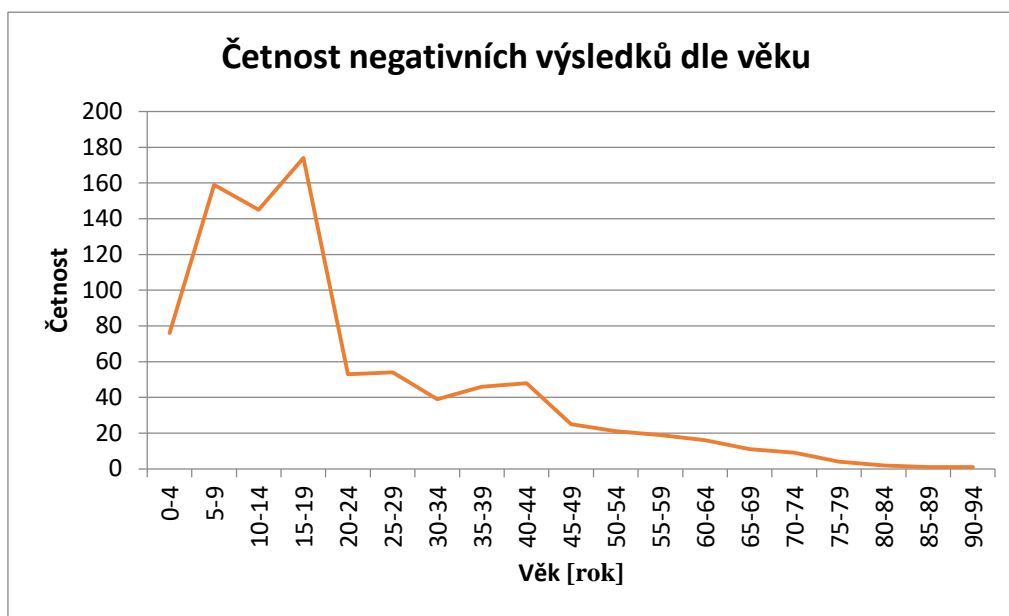
Následující graf ukazuje, že nárůst primoinfekcí není závislý na ročním období.



**Obrázek 8:** Četnost primoinfekcí v průběhu roku 2019 (Zdroj: Vlastní)

#### 4.4 Četnost negativních výsledků dle věku

Mezi 15. – 19. rokem se křivka významně láme k nižším hodnotám negativních výsledků. V pozdních letech jsou přírůstky v jednotkách případů.



Obrázek 9: Četnost negativních výsledků dle věku (Zdroj: Vlastní)

#### 4.5 Promořenost testovaného vzorku

Pro určení promořenosti, respektive nepromořenosti dospělé části testovaného vzorku byly zvoleny výsledky negativních testů u osob starších dvaceti let:

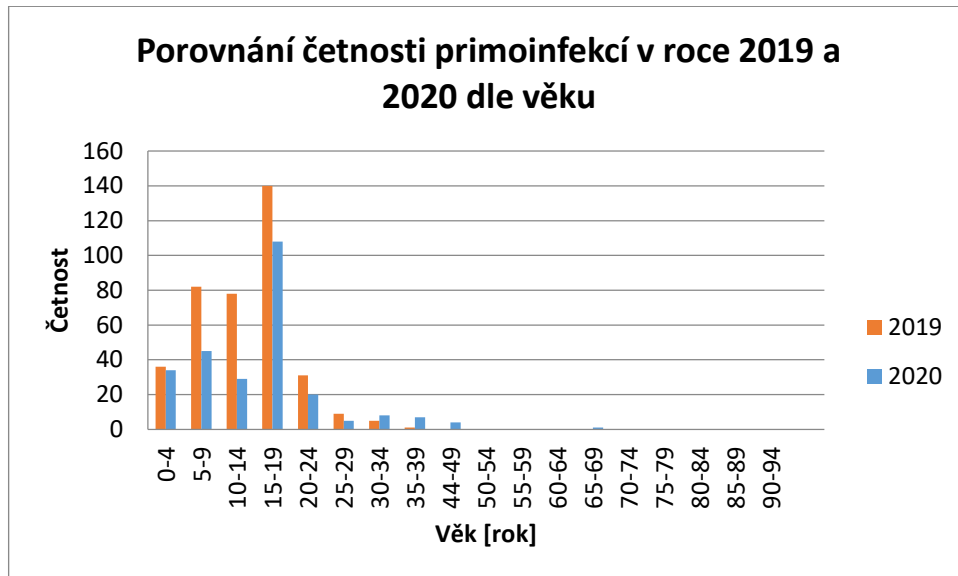
Tabulka 6: Podíl negativních výsledků v testovaném vzorku

Počet negativních výsledků	Celkový počet testů	Podíl negativních
349	1925	18 %

Zdroj: Vlastní

#### 4.6 Porovnání četnosti primoinfekcí v roce 2019 a 2020 dle věku

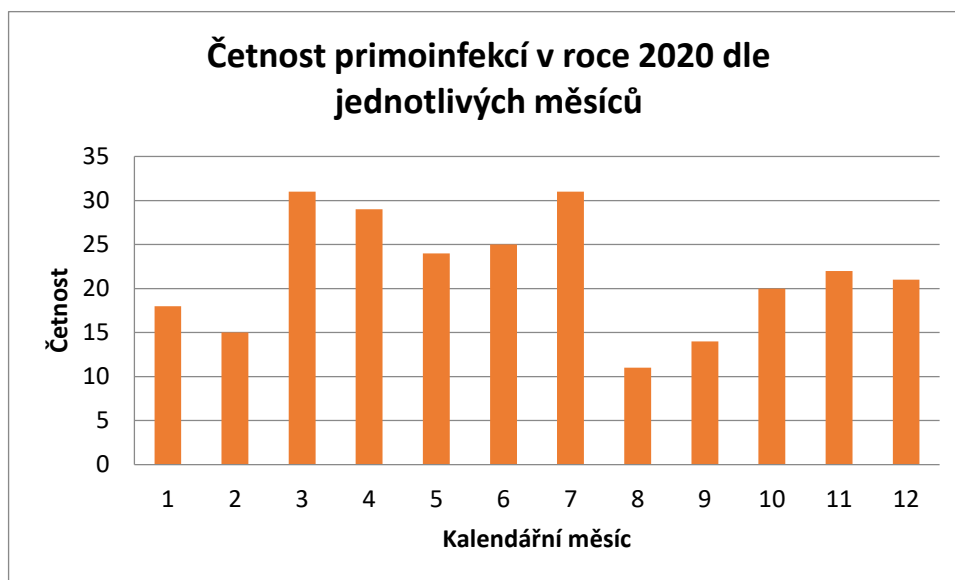
V roce 2019 bylo Laboratoří Brno synlab czech, s. r. o. otestováno na specifické protilátky proti EBV sérum od 3500 pacientů. Primoinfekce byla prokázána u 261 z nich (7 %). Následující graf (obr. 9) znázorňuje rozdíly v četnosti primoinfekcí oproti roku 2019.



**Obrázek 10:** Porovnání četnosti primoinfekcí v roce 2019 a 2020 dle věku.  
Zdroj: Vlastní

#### 4.7 Četnost primoinfekcí v roce 2020 dle jednotlivých kalendářních měsíců

Graf četnosti primoinfekcí v roce 2020 rozdělený po jednotlivých kalendářních měsících vykazuje sezónní charakter.



**Obrázek 11:** Četnost primoinfekcí v roce 2020 dle jednotlivých kalendářních měsíců. Zdroj: vlastní

## 5 DISKUZE

Diagnostika a zejména určení stádia EBV infekce je náročný proces. Vyžaduje znalost dynamických změn v tvorbě jednotlivých protilátek, jež odráží expresi genů kódujících EBV antigeny. Kromě laboratorního vyšetření je třeba zhodnotit i klinické projevy, aby mohla být spolehlivě určena EBV infekce.

V roce 2019 bylo v Laboratoři Brno synlab czech, s. r. o. vyšetřeno 3899 pacientů na protilátky proti EBV antigenům.

Vzhledem k tomu, že je EBV přenášeno zejména slinami, dá se očekávat nárůst infekcí v období puberty, kdy člověk začíná utvářet užší kontakty s opačným pohlavím. Mým očekáváním bylo, že se prvotní kontakt s EBV posouvá do dospělosti k 20. roku života. Výsledky však ukazují významný nárůst EBV infekcí ve věku mezi 14–19 roky života s maximem v sedmnácti letech, jak uvádí i odborná literatura (Goering, 2016). Došlo však k výraznému nárůstu primárních infekcí u chlapců ve věku sedmi let. Zde výsledky ukazují, že se u dětí posouvá věk primoinfekce k vyšší hranici věkového intervalu uváděného literaturou 1–6 let.

Z výsledků za jednotlivé kalendářní měsíce vyplývá, že v našich podmínkách nemá EBV infekce sezónní charakter. Incidence primárních infekcí se pohybovala celý rok v podobných číslech.

Negativních výsledků s věkem ubývá. To je dáno postupným proměřováním populace, než dosáhne svého maxima. Krejsek (2016) udává maximum ve 100 % měření. Z výsledků je však zřejmé, že primární infekce se v jednotkách objevují i ve věku nad sedmdesát let. To může být přítomností vhodných jedinečných vlastností pacienta, které zabrání vstupu viru do buněk. Prudký pokles četnosti negativních výsledků nastává po pubertě, kdy se mezilidské vztahy ustalují.

Promořenost byla hodnocena u osob starších 20 let. U testovaného vzorku se prokázala nepromořenost 18 %, tedy výrazně vyšší, než bylo očekávané (0 %).

V roce 2020 i přes restriční opatření z důvodu pandemie SARS-CoV-2 nedošlo k výraznějšímu poklesu incidence primoinfekcí. Pokles znázorněný oproti roku 2019 spíše odpovídá menšímu počtu provedených testů, celkový trend se však oproti roku 2019 nezměnil. Stále výsledky ukazují nejvyšší nárůst v období puberty.

Zajímavý je ale tvar křivky, pokud rozdělíme četnost primoinfekcí dle jednotlivých kalendářních měsíců. Zde jsou patrné dva poklesy v četnosti primoinfekcí zhruba měsíc až dva po zavedení tvrdých restrikcí z důvodu pandemie SARS-CoV-2. Zmíněné opožďení koreluje s inkubační dobou EBV infekce. Lze tedy očekávat, že omezení kontaktu mezi lidmi se projeví nejdříve za měsíc.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části jsem shrnula dosavadní poznatky související s infekcí EBV. V praktické části jsem se zaměřila na metodu stanovení protilátek proti jednotlivým antigenům EBV. Ač se zdá být obsluha přístroje a vlastní analýza jednoduchá, u vlastního vyhodnocení výsledků je tomu naopak. Aby byla stanovena správná diagnóza, nestačí sledovat jediný parametr. Navíc je potřeba znát dynamiku protilátek v průběhu infekce EBV a získané výsledky zhodnotit i ve vztahu s klinickou diagnózou.

Je příjemné sledovat, jakou rychlostí se laboratorní diagnostika mění v čase. Zatímco Votava (2003) uvádí jako hlavní metodu laboratorního stanovení test na heterofilní protilátky a metodu chemiluminiscence považuje za nákladnou a využívanou jen v indikovaných případech, dnes je vyšetření protilátek proti EBV metodou chemiluminiscenční imunoanalýzy rutinní záležitostí.

Vyšetření vzorků pomocí této metody poskytlo cenná data pro hodnocení promořenosti obyvatel EBV infekcí.

Výsledky ukazují, že se posouvá věk dětí pro primární infekci z batolecího věku spíše do školního a v důsledku menšího kontaktu lidí se zvyšuje podíl séronegativních jedinců. To s sebou však může přinášet horší průběh infekce.

Výsledky vyšetření za rok 2020 byly hodnoceny ve vztahu k aktuální pandemii SARS-CoV-2, kde se opět projevuje menší osobní kontakt v důsledku vládních restrikcí.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. AMBROŽOVÁ, H. Infekční mononukleóza. *Pediatric pro praxi* [online]. Solen, 2005, **6**(5), 244–246 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 12130494. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2005/05/05.pdf>
2. BALFOUR, H. Epstein Barr Virus Infections – Pay Me Now or Pay Me Later. In: Youtube [online]. 18. května 2016 [cit. 21. 4. 2021]. Dostupné z: [https://www.youtube.com/watch?v=6Ddjr\\_zs9Og](https://www.youtube.com/watch?v=6Ddjr_zs9Og)
3. BARTŮŇKOVÁ, J., PANZNER, P. *Klinická imunologie a alergologie pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Raabe, 2019. ISBN 978-80-7496-423-7
4. BECKMAN COULTER. *Návod k použití: AutoMate 2500 Family. Verze softwaru 4.1.1: Systém pro zpracování vzorků*. München: Becman Couletr, únor 2013. B07562A
5. BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1
6. CIBIČEK, N., VACEK, J. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8
7. CINQUANTA, L., FONTANA, Desré E., BIZZARO, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights* [online]. 24 June 2017, **8**(1), 9 [cit. 3. 5. 2021]. ISSN 2038-0305, 2038-3274. DOI:10.1007/s13317-017-0097
8. DE PASCHALE, M., CLERICI, P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* [online]. 12 February 2012, **1**(1), 31-43 [cit. 21. 4. 2021]. DOI:10.5501/wjv.v1.i1.31. PMID: 24175209; PMCID: PMC3782265.
9. DiaSorin S.p.A. *Metodický list: LIAISON<sup>®</sup> EA IgG*. Saluggia, 2019. CS-200/007-853
10. DiaSorin S.p.A. *Metodický list: LIAISON<sup>®</sup> EBNA IgG*. Saluggia, 2019. CS-200/007-839
11. DiaSorin S.p.A. *Metodický list: LIAISON<sup>®</sup> EBV IgM*. Saluggia, 2020. CS-200/007-837
12. DiaSorin S.p.A. *Metodický list: LIAISON<sup>®</sup> VCA IgG*. Saluggia, 2019. CS-200/007-838



13. ESAU, D. Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein–Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus 1. *Virology: Research and Treatment* [online]. Sage. 7 November 2017, **8**, 1–5 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 1178-122X. DOI:10.1177/1178122X17731772
14. FEDER, Henry M. Jr., REZUKE, William N. Infectious mononucleosis diagnosed by Downey cells: sometimes the old ways are better. *The Lancet* [online]. Elsevier. 18 January 2020, **395**(10219), 225 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 0140-6736. DOI:10.1016/S0140-6736(19)32962-9
15. FINGEROTH, J. Epstein–Barr Virus. In: RICHMAN, Douglas D., WHITLEY Richard J., HAYDEN, Frederick J. *Clinical Virology*. [online]. Fourth Edition. Washington, DC: AMS Press, 2017 [cit. 21. 4. 2021]. ISBN 9781683670674. Dostupné prostřednictvím Wiley Online Library. DOI:10.1128/9781555819439
16. FRANEKOVÁ, J., JABOR, A. Vliv preanalitické fáze na interpretaci laboratorních nálezů. *Královéhradecký laboratorní bulletin. Informace pro lékaře a zdravotníky* [online]. Květen 2020, **1**, 1–2 [cit. 20. 4. 2021]. Dostupné z: [www.axis-cz.cz/dokumenty/axis-medila-bulletin-1-2020.pdf](http://www.axis-cz.cz/dokumenty/axis-medila-bulletin-1-2020.pdf)
17. GOERING, Richard V. et al. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0
18. GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-365-0
19. HAVLÍK, J. et al. *Infekční nemoci*. Druhé, rozšířené vydání. Praha: Galén, 2002. ISBN 807262-173-4
20. HENLE, W., HENLE, G., LENNETTE, Evelyne T. The Epstein–Barr Virus. *Scientific American* [online]. Scientific American, a division of Nature America, Inc., July 1979, **241**(1), 48–59 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 00368733. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/24965241>
21. HOFFMANN, G. The History of Mononucleosis. In: *Mononucleosis*. New York: Marshall Cavendish Benchmark, 2006, s. 30–37. ISBN 0-7614-1915-2
22. HUSA, P., KRBKOVÁ, L. et al. *Infekční lékařství*. Brno: Masarykova univerzita, 2019. ISBN 978-80-210-9438-3
23. JARASCH, Ersnt-Dieter. Vaccination against oncogenic Epstein-Barr viruses [online]. ©Biopro Baden-Württemberg. 5-March-2019 [cit. 21. 4. 2021].

- Dostupné z:<https://www.gesundheitsindustriew.de/en/article/news/vaccination-against-oncogenic-epstein-barr-viruses>
24. KANG, MS., KIEFF, E. Epstein–Barr virus latent genes. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. 1 January 2015, **47**(1), e131 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 2092-6413. DOI:10.1038/emm.2014.84
  25. KOUBA, K. et al. *Infekční mononukleóza*. Praha: Avicenum, 1988.
  26. LEVY, Jay A. Gertrude S. Henle (1912–2006). *Virology* [online]. Elsevier. 5 February 2007, **358**(1), 248–250 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 0042-6822. Dostupné prostřednictvím Science Direct. DOI:10.1016/j.virol.2006.11.001
  27. KREJSEK, J. et. al. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon, 2016. ISBN 978-80-86472-74-4
  28. SMÍŠKOVÁ, D. Infekční mononukleóza a další onemocnění vyvolaná virem Epsteinova a Barrové. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, **14**(6 a 7), 261–263 [cit. 21. 4. 2021]. Dostupné z:  
<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/06/06.pdf>
  29. SOP T.BM 10: *Obsluha, údržba, kalibrace a interní hodnocení kvality na analyzátoru LIAISON<sup>®</sup> XL*. 2019
  30. ŠIMEK, P. *Jednotlivé fáze instrumentální analýzy, základy vyhodnocení výsledků analytických měření* [přednáška]. České Budějovice: ZSF JČU v Českých Budějovicích, 15. 3. 2019
  31. ROHÁČOVÁ, H. Onemocnění vyvolaná virem Epsteinova-Barrové. *Interní medicína pro praxi*. [online]. 2005, **7**(6), 301–302 [cit. 21. 4. 2021]. Dostupné z:  
<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/06/06.pdf>
  32. ROLF, L. et al. Exploring the effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation on the anti-EBV antibody response in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* [online]. September 2018, **24**(10), 1280-1287 [cit. 21. 4. 2021]. ISSN 1352-4585, 1477-0970. DOI: 10.1177/1352458517722646
  33. VIDIA [online leták]. *Virus Epsteinova a Barrové: ELISA STANOVENÍ PROTILÁTEK IgG, IgM i IgA*. 2017 [cit. 3. 5. 2021]. Dostupné z:  
[https://www.vidia.cz/images/letaky/EBV-CZ\\_2017.pdf](https://www.vidia.cz/images/letaky/EBV-CZ_2017.pdf)
  34. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5
  35. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7

## 8 OBRÁZKY

<https://slidetodoc.com/human-herpes-viruses-1-dr-d-kalita-associate>

## 9 SEZNAM ZKRATEK

<b>BL</b>	Burkittův lymfom
<b>CLIA</b>	chemiluminiscenční analýza
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EA</b>	časný antigen
<b>EBNA</b>	jaderný antigen
<b>EBV</b>	virus Epstein–Barrové
<b>GP (gp)</b>	glykoprotein
<b>HHV4</b>	lidský herpes virus 4
<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>IL-10</b>	interleukin 10
<b>IM</b>	infekční mononukleóza
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>LIS</b>	laboratorní informační systém
<b>NK</b>	přirozený zabíječ (natural killer)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>RFID</b>	radiofrekvenční identifikační transpondér
<b>RLU</b>	relativní světelná jednotka
<b>VCA</b>	antigen virové kapsidy