

©Borgis

*Katarzyna Leś¹, Maciej Przybylski^{1,2}, Bożena Łazińska^{1,3}

Diagnostyka laboratoryjna mononukleozy zakaźnej u chorych leczonych ambulatoryjnie

Laboratory diagnosis of infectious mononucleosis on an outpatient basis

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk

²Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa

P.o. Kierownika Zakładu: dr hab. n. med. Marta Wróblewska

³Centralne Laboratorium, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, Warszawa

Kierownik Laboratorium: dr n. med. Dorota Matuszewicz

Słowa kluczowe

wirus Epsteina-Barr, mononukleozą zakaźną, diagnostyka laboratoryjna, patogeneza

Key words

Epstein-Barr virus, infectious mononucleosis, clinical laboratory techniques, pathogenesis

Adres/address:

*Katarzyna Leś

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej WUM

ul. Chałubińskiego 4, 02-004 Warszawa

tel. +48 (22) 622-00-28

katarzynaales1@wp.pl

Streszczenie

Pierwotna infekcja wirusem Epsteina-Barr (EBV) może się objawiać gorączką, wysiękowym zapaleniem gardła, limfadenopatią, hepatosplenomegalią i atypową limfocytozą. Okres wylegania choroby wynosi od 30 do 50 dni. Częstość zachorowań nie ma związku z porą roku, płcią czy pochodzeniem etnicznym. Najczęściej wykonywanymi badaniami są morfologia z rozmazem mikroskopowym, oznaczenie poziomu CRP, aktywności transaminaz wątrobowych oraz przeciwciał heterofilnych. Nie we wszystkich przypadkach jest to wystarczające do jednoznacznego rozpoznania zakażenia EBV. Objawy towarzyszące zakażeniu mogą nie mieć jednoznacznego charakteru, dlatego diagnostyka infekcji EBV powinna opierać się również na oznaczaniu swoistych przeciwciał. Wykrycie przeciwciał VCA IgM w większości przypadków wystarcza zazwyczaj do zdiagnozowania pierwotnego zakażenia EBV. W przypadkach nietypowych możliwe jest wykrywanie i monitorowanie przeciwciał przeciwko antygenom kapsydowemu, wczesnemu i jądrowemu. W diagnostyce ambulatoryjnej rzadko stosuje się metody wykrywające materiał genetyczny wirusa. Istnieje szereg czynników mających wpływ na wyniki badań laboratoryjnych.

Artykuł podsumowuje możliwości diagnostyczne w rozpoznawaniu mononukleozy zakaźnej w odniesieniu do patogenezy pierwotnego zakażenia wirusem Epsteina-Barr.

Summary

Primary infection with Epstein-Barr virus (EBV) may be accompanied with fever, exudative pharyngitis, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly and presence of atypical lymphocytes. The incubation period of the disease ranges from 30 to 50 days. There is no strong correlation between incidence of IM and sex, season of the year or socioeconomic status. Basic laboratory tests used for diagnosis of infectious mononucleosis include microscopic blood investigation, C-reactive protein, levels of liver transaminases, and detection of heterophile antibodies. Not all cases of infectious mononucleosis in children can be unambiguously identified with above methods. Enlargement of lymph nodes, liver and spleen is observed also in other diseases, thus diagnosis of EBV infection should include specific serological tests. Generally three types of antibodies are detected: anti-VCA, -EA and -EBNA. In most cases positive result for VCA antibodies is sufficient to confirm primary infection. Analysis of EBV DNA are seldom used in out-patient care. Series of factors affecting results of laboratory tests should be considered to obtain trustworthy results.

The article summarises options in laboratory diagnosis of primary EBV infection on the background of the disease pathogenesis.

WSTĘP

Wirus Epsteina-Barr (EBV, inaczej *Human herpesvirus 4* – HHV-4) jest herpeswirusem należącym do podrodziny *Gammapherpesvirinae* i rodzaju *Lymphocryptovirus*. Znane są dwa typy wirusa: EBV-1 i EBV-2, różniące się w niewielkim stopniu chorobotwórczością.

Wirion ma kształt sferyczny, jego zewnętrzną warstwę stanowi lipidowa osłonka, zawierająca glikoproteiny powierzchniowe, które odpowiadają za adsorpcję do receptorów komórkowych i wnikanie wirusa do komórki. Kapsyd ma symetrię dwudziestościanową i jest zbudowany ze 162 kapsomerów. Między kapsydem

a osłonką znajduje się warstwa białkowa, zawierająca białka o aktywności enzymatycznej, niezbędne we wczesnych etapach zakażenia komórki. Genom EBV ma postać dwuniciowej, liniowej cząsteczki DNA o długości 172 par zasad i koduje prawie 100 białek (1, 2).

Historia odkrycia HHV-4 zaczęła się w Afryce w latach 50. XX wieku. Irlandzki chirurg, Denis Burkitt, prowadził tam prace nad endemicznym nowotworem występującym u dzieci, lokalizującym się w obrębie szczęki oraz żuchwy. W kontekście badań prowadzonych w tamtych latach nad chłoniakami pojawiającymi się u drobiu w przebiegu choroby Mareka (także wywoływanej przez herpeswirusa), charakter chłoniaka Burkitta zainspirował wirusologów: Michaela Anthony'ego Epsteina, Berta Achonga oraz Yvonne Barr do poszukiwań czynnika wirusowego odpowiedzialnego za ten niezwykle agresywny nowotwór. Uwidocznienie przy użyciu mikroskopii elektronowej wirionów o morfologii charakterystycznej dla herpeswirusów w tkance pobranej bezpośrednio z chłoniaka Burkitta, a także późniejsze potwierdzenie ich obecności w komórkach chłoniaka utrzymywanych w warunkach *in vitro* wskazało na rolę nowo odkrytego (1964) herpeswirusa w etiologii nowotworu (3, 4). Na ostateczne potwierdzenie jednoznacznego związku EBV z chłoniakiem Burkitta trzeba było jednak czekać przez kolejne 14 lat, do czasu opublikowania wyników badań przeprowadzonych pod auspicjami WHO na grupie 42 000 afrykańskich dzieci (5). Znacznie wcześniej, bo już w 1968 roku powiązano EBV z mononukleozą zakaźną (6). Tutaj dużą rolę odegrał przypadek: techniczka, której surowica użyta została jako kontrola ujemna w pierwszej fazie badań serologicznych, zachorowała w międzyczasie na mononukleozę. Po jej powrocie do zdrowia przeprowadzono kolejne badanie i w pobranej na bieżąco próbce surowicy wykryto przeciwciała swoiste dla EBV. Ta obserwacja skierowała badaczy na właściwy trop i doprowadziła do szybkiego wskazania na HHV-4 jako czynnika etiologicznego mononukleozy zakaźnej.

Analizując zagadnienia związane z diagnostyką pierwotnych zakażeń EBV, warto wziąć pod uwagę podstawowe mechanizmy interakcji między wirusem a jego gospodarzem. Jedną z najważniejszych cech HHV-4 (podobnie jak w przypadku pozostałych herpeswirusów zakażających człowieka) jest jego nadzwyczajna adaptacja do organizmu człowieka, wynikająca z faktu, iż EBV jest związany z gatunkiem ludzkim – według ostrożnych szacunków – od tysięcy lat (7). W tym czasie EBV rozwinął szereg sposobów umożliwiających mu utrzymanie wieloletniego zakażenia wybranych komórek bez wywoływania stanu zapalnego ani innych negatywnych skutków dla ustroju gospodarza.

W przebiegu zakażenia pierwotnego, głównym celem dla EBV są komórki nabłonkowe i limfocyty B. Prócz tego wirus może zakażać limfocyty T, komórki NK, komórki dendrytyczne oraz makrofagi. W początkowym okresie zakażenia wirus wnika do komórek nabłonkowych jamy nosowo-gardłowej, gdzie dochodzi do namnażania cząstek wirusowych, lizy zakażonych komórek nabłonkowych, a następnie rozprzestrzeniania się zakażenia do

sąsiadujących struktur anatomicznych, np. ślinianek. Zapalenie gardła jest najprawdopodobniej wynikiem intensywnego miejscowego namnażania cząstek wirusowych w komórkach nabłonkowych i limfatycznych. Wnikanie EBV do limfocytów B odbywa się za pośrednictwem receptora CD21, który nie występuje na powierzchni większości komórek nabłonkowych. Przedstawiono kilka hipotez dotyczących mechanizmu adsorpcji i wnikania EBV do komórek nabłonkowych nieposiadających CD21 (8, 9). Wykazano na przykład, że podczas pierwotnej infekcji zlokalizowanej w obrębie nosogardzieli większość wirionów EBV, po adsorpcji do limfocytów B, nie wnika do ich wnętrza, lecz limfocyty takie tworzą agregaty z komórkami nabłonkowymi, umożliwiając wirusom masywne zakażenie produktywnie komórek nabłonkowych, co prowadzi do uwalniania dużej ilości cząstek EBV. Poza tym, wirus posiada możliwość aktywacji powierzchniowych integrin komórek nabłonkowych, które wchodzi w interakcje z limfocytami (10). Integryny pośrednio wpływają na reorganizację cytoszkieletu komórki nabłonkowej, dzięki czemu wnikanie EBV zachodzi bez endocytozy (11). Limfocyty B mogą być celem zakażenia produktywnego, które ostatecznie kończy się lizą komórki, ale mogą też ulec nieswoistej aktywacji, proliferacji oraz ekspansji. Jest to zjawisko patologiczne: przeciwciała produkowane przez aktywowane EBV komórki plazmatyczne są skierowane przeciwko losowym antygenom, a zakażone limfocyty są z jednej strony celem ataku komórek cytotoksycznych, zaś z drugiej, po pewnym czasie ulegają anergii. Należy zaznaczyć, że proliferujące limfocyty B (obok komórek zakażanych *de novo*) są znaczącym rezerwuarem wirusa w organizmie – ich liczba wzrasta wraz z rozwojem infekcji, ulegają także rozsiewowi poprzez krew i limfę (12).

Na tym etapie zakażenia rozpoczyna się masywna immunologiczna odpowiedź swoista skierowana przeciwko EBV, którego antygeny wykazują silną immunogenność. Zadanie układu odpornościowego jest złożone i polega na jednoczesnym ograniczaniu zakażenia poprzez eliminację limfocytów noszących wirus, kontroli poziomu ich nieswoistej proliferacji oraz hamowaniu rozwoju niekontrolowanej kaskady zapalnej (12). Wymagane dla skutecznej walki z EBV utrzymanie perfekcyjnej równowagi w odpowiedzi immunologicznej jest też powodem, dla którego zakażenia EBV przebiegają najciężej u osób z niedoborami funkcji limfocytów T-pomocniczych (np. w chorobie Duncana). W początkowej fazie zakażenia dochodzi do syntezy znacznej ilości przeciwciał nieswoistych klasy IgM (przeciwciała heterofilne), a następnie – wraz z prawidłową aktywacją limfocytów przez antygeny EBV – do syntezy przeciwciał swoistych. Swoista odpowiedź komórkowa polega przede wszystkim na aktywności limfocytów cytotoksycznych CD8+, czego skutkiem jest także przejściowa zmiana we wzajemnym stosunku limfocytów CD4+/CD8+ (13-17). Oprócz bezpośredniej aktywności cytotoksycznej, limfocyty CD8+ wydzielają duże ilości cytokin (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF), przy czym obserwuje się subpopulacje fenotypowe limfocytów syntetyzujących różne profile cytokin. Uważa się, że to właśnie aktywność limfocytów CD8+ jest odpowiedzialna

za większość objawów mononukleozy zakaźnej (16, 17); udowodniono, że zwiększona liczba tych komórek pozostaje w korelacji z nasileniem objawów mononukleozy zakaźnej (18). Zadaniem innych komórek (komórki NK, limfocyty CD 4+) jest kontrola liczebności limfocytów B zakażonych wirusem.

Swoista odpowiedź humoralna w trakcie infekcji EBV polega na produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim antygenom wirusa (zarówno wchodzącym w skład dojrzałego wirionu, jak i produkowanym tylko wewnątrz zakażonych komórek). Z diagnostycznego punktu widzenia istotną rolę odgrywa wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi kapsydu (VCA), antygenowi wczesnemu (EA) oraz antygenowi jądrowemu (EBNA).

Zakażenie pierwotne wirusem Epsteina-Barr, o ile przebiega w formie objawowej, najczęściej przybiera formę zespołu określanego jako „mononukleozą zakaźną”. Choroba objawia się wysiękowym zapaleniem gardła, powiększeniem węzłów chłonnych, migdałków, wystąpieniem charakterystycznego nalotu na migdałkach i tylnej ścianie gardła, hepato- i splenomegalią oraz długo utrzymującą się gorączką. Powiększenie śledziony występuje u 50%, a powiększenie wątroby u 10% dzieci chorych na mononukleozę, przy czym dane te należy traktować orientacyjnie, gdyż różne źródła informacji podają różny odsetek chorych z tymi objawami (7). Charakterystyczne w przebiegu mononukleozy są zmiany w obrazie krwi obwodowej. Przebieg choroby może być zróżnicowany, od subklinicznego do zagrażającego życiu, lecz w większości przypadków ma charakter samoograniczającej się infekcji o wydłużonym czasie trwania (w porównaniu z innymi ostrymi pierwotnymi zakażeniami wirusowymi). Na zakażenie EBV narażone są zasadniczo dwie grupy wiekowe: dzieci w wieku od 2 do 7 lat oraz nastolatki i młodzi dorośli. Do zakażenia małych dzieci dochodzi najczęściej w wyniku kontaktu z wydzielinami (najczęściej śliną) osoby zakażonej, na drodze bezpośredniej lub przez przedmioty, np. skażone zabawki. Za główną drogę przenoszenia w starszej grupie wiekowej uważa się bliski kontakt, w tym pocałunki. Wydalanie wirusa ze śliną może trwać przez wiele miesięcy po ustąpieniu objawów, obserwuje się także bezobjawowe wydzielenie wirusa w wyniku jego reaktywacji (7). Okres wylegania mononukleozy zakaźnej wynosi od 30 do 50 dni. Częstość zachorowań nie ma związku z porą roku, płcią czy pochodzeniem etnicznym (19, 20).

Wiek, w którym dochodzi do pierwotnej infekcji HHV-4, zależy przede wszystkim od statusu socjoekonomicznego populacji. W krajach rozwijających się dzieci ulegają zakażeniu znacznie wcześniej i w większym odsetku niż w krajach zamożnych, ale przebiega ono zazwyczaj bezobjawowo i można je potwierdzić tylko poprzez wykazanie serokonwersji.

Po przejściu zakażenia pierwotnego wirus pozostaje w stanie latencji, a w sprzyjających warunkach ulega re-

aktywacjom, które zazwyczaj są bezobjawowe, lecz wiążą się z wydzieleniem wirusa ze śliną i innymi wydzielinami.

DIAGNOSTYKA MONONUKLEOZY ZAKAŹNEJ

Badania laboratoryjne

W rozpoznaniu uwzględnia się występowanie objawów klinicznych i wyniki badań laboratoryjnych. Najbardziej charakterystyczną cechą zakażenia są zmiany w obrazie krwi obwodowej, występujące praktycznie u wszystkich chorych. W pierwszych dniach po wystąpieniu objawów, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci można zaobserwować leukopenię z granulocytopenią. Taki obraz krwi obwodowej występuje w zasadzie w większości infekcji wirusowych (12). Na tym etapie przebiegu infekcji nie sugeruje jeszcze zakażenia HHV-4. U dzieci kilkuletnich liczba leukocytów zazwyczaj nie przekracza 10 tys./mm³, a w rozmazie krwi obwodowej wykonanym metodą automatyczną można zaobserwować nieodbiegający od normy obraz białych krwinek i pojedyncze atypowe limfocyty. Lekarze pediatry zazwyczaj proszą po kilku dniach o powtórne wykonanie morfologii krwi obwodowej z rozmazem mikroskopowym. Dodatkowo, dosyć często zleca się oznaczenie CRP i OB, które na wczesnym etapie zakażenia powinny pozostawać w zakresie wartości referencyjnych. Podwyższone wartości CRP i OB w tej sytuacji sugerować mogą współistniejące zakażenie bakteryjne. Z przyczyn ekonomicznych, dosyć często w ramach opieki POZ pediatry stawiają diagnozę mononukleozy zakaźnej, opierając się wyłącznie na wynikach wyżej wymienionych badań. Wraz z rozwojem infekcji stwierdza się wzrost liczby leukocytów z zarysowującą się przewagą limfocytów; liczba krwinek białych wynosi najczęściej od 10 do 20 tys./mm³ (7, 12, 21). Tylko u 15% pacjentów dochodzi do zwiększenia liczby leukocytów powyżej 20 tys./mm³ (12). U 25-50% chorych obserwuje się niezbyt nasiloną małopłytkowość, zazwyczaj w granicach 100-200 tys./mm³ (7). Liczba płytek krwi rzadko kiedy spada poniżej 100 tys./mm³.

Oprócz podstawowej morfologii krwi obwodowej, ważnym elementem diagnostyki zakażeń EBV jest ocena mikroskopowa rozmazu. Podstawową informacją uzyskaną w tym badaniu jest stwierdzenie obecności dużych limfocytów, zwanych atypowymi ze względu na swoją morfologię. Komórki te mogą mieć różne postaci. Można zaobserwować duże limfocyty o płatowatym jądrze, przypominające pod tym względem monocyty, komórki podobne do plazmocytów z jądrem kształtu nerkowatego lub komórki, w których jądro położone jest mimośrodkowo (25, 26). Cechą charakterystyczną limfocytów atypowych jest duże jądro z chromatyną luźniejszą niż w limfocytach prawidłowych. Cytoplazma może być obfita i intensywnie niebieska. Z racji zróżnicowania morfologicznego limfocytów atypowych, ich prawidłowa identyfikacja może niekiedy nastęrczać problemów. Heterogenność populacji atypowych limfocytów w przebiegu zakażenia EBV jest cechą odróżniającą je od jednorodnej populacji komórek limfoblastycznych obserwowanych w białaczkach (27). Jeśli odsetek limfocytów atypowych wynosi

15-20%, to z dużym prawdopodobieństwem można podejrzewać zakażenie HHV-4. Warto jednak zaznaczyć, że te komórki występują również w przebiegu innych infekcji, wywołanych np. przez wirusa cytomegalii lub HHV-6A/6B.

Kolejną informacją, istotną w diagnostyce mononukleozy zakaźnej, jest ocena aktywności transaminaz. Cechy łagodnego zapalenia wątroby w przebiegu zakażenia EBV mają charakter przejściowy, ale są obserwowane na tyle często, aby brać je pod uwagę. Podwyższony poziom enzymów wątrobowych u dorosłych notuje się najczęściej między 2. a 3. tygodniem od wystąpienia objawów (20, 21). W przypadku małych dzieci brak jest niestety jednoznacznych danych. Odnośnie określenia „licząc od wystąpienia objawów mononukleozy”, należy mieć na uwadze możliwość wystąpienia zakażenia skąpopobjawowego, w którym trudno jest określić ten punkt odniesienia. Należy pamiętać także, że dane literaturowe dotyczące roli oceny poziomu transaminaz w rozpoznaniu mononukleozy pochodzą z obserwacji dzieci hospitalizowanych, czyli przechodzących tę chorobę ciężiej niż w przypadku chorych diagnozowanych ambulatoryjnie. Duże znaczenie odgrywa tutaj indywidualny przebieg zakażenia EBV oraz moment rozpoczęcia badań diagnostycznych. W praktyce, u dzieci chorych na mononukleozę obserwuje się szeroką rozpiętość wyników badania transaminazy alaninowej – od kilkudziesięciu do kilku tysięcy U/L.

Nieswoiste testy przesiewowe

Z zamierzenia proste w wykonaniu i służące do wstępnej diagnostyki mononukleozy, klasyczne serologiczne testy nieswoiste opierają się na aglutynacji erytrocytów baranich, końskich lub bydłych w obecności przeciwciał heterofilnych. Pierwotny test Paula-Bunnella-Davidsohna wykonywano z użyciem krwinek czerwonych barana, natomiast obecnie używa się krwinek końskich (test Monospot), gdyż charakteryzują się one większą czułością (85%) oraz prawie stu-procentową swoistością (27). Wynik testu wykorzystującego erytrocyty baranie pozostaje dodatni po kilku miesiącach od wystąpienia objawów, a testu Monospot – nawet po dwóch latach. Długi czas utrzymywania się przeciwciał heterofilnych może prowadzić do omyłkowego rozpoznania mononukleozy w przypadku innych chorób gorączkowych o zbliżonym obrazie klinicznym, a co za tym idzie opóźnienia prawidłowej diagnozy.

Przeciwciała heterofilne można wykrywać także za pomocą testów opierających się na aglutynacji kulek polistyrenowych opłaszczonych antygenami uzyskanymi z erytrocytów bydłych (wolnych od antygeny Forssmana). Antygeny te znalazły także zastosowanie przy opracowaniu szybkich testów immunochromatograficznych służących do wykrywania przeciwciał heterofilnych.

Obecność przeciwciał heterofilnych w pierwotnej infekcji EBV stwierdza się tylko u 50% dzieci poniżej 5. roku życia oraz u 90% dorosłych, u których przeciwciała te osiągną miana dające się wykryć metodami laboratoryjnymi już w pierwszym tygodniu od wystąpienia objawów (dotyczy to około 40% chorych). W miarę rozwoju zakaże-

nia, wzrasta miano przeciwciał heterofilnych, są one wykrywane u 60% chorych w drugim, a u 90% w czwartym tygodniu od wystąpienia objawów (27). U pacjentów pediatrycznych niestety nie dysponujemy dokładnymi danymi dotyczącymi odsetka chorych, u których można wykryć przeciwciała heterofilne, ani czasu, po którym należy spodziewać się dodatniego wyniku badania. U dzieci poniżej 4. roku życia diagnostyka mononukleozy zakaźnej nie może opierać się na wyniku badania przesiewowego, gdyż nierzadko obserwuje się sytuacje, w których mamy do czynienia z ujemnym wynikiem testu przesiewowego, a zmiany hematologiczne i objawy kliniczne ewidentnie wskazują na pierwotne zakażenie EBV. W takiej sytuacji zaleca się wykonanie powtórnego oznaczenia po 7-10 dniach lub oznaczenie swoistych przeciwciał. Z drugiej strony, jeśli typowy obraz kliniczny jest potwierdzony dodatnim wynikiem testu przesiewowego, to nie ma konieczności wykonywania serologicznych badań swoistych (dotyczy to wszystkich grup wiekowych). Wyniki fałszywie dodatnie zdarzają się rzadko i najczęściej odpowiadają wynikom obserwowanym przy niskich mianach przeciwciał heterofilnych.

Swoiste testy serologiczne

Objęmuje one szereg metod (ELISA, Western-blot) służących do wykrywania oraz określenia miana przeciwciał swoistych przeciwko antygenom EBV. Najczęściej wykrywa się przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi kapsydu EBV (ang. *viral capsid antigen* – VCA), antygenowi wczesnemu (ang. *early antigen* – EA) oraz antygenowi jądrowemu (ang. *Epstein-Barr nuclear antigen* – EBNA). Sekwencja pojawiania się przeciwciał w sposób naturalny odzwierciedla przebieg zakażenia. Masywna replikacja EBV w początkowych etapach zakażenia prowadzi do intensywnego pobudzenia odpowiedzi humoralnej stymulowanej antygenami wchodzącymi w skład wirionów oraz uwolnionymi z komórek zniszczonych w wyniku lizy, będącej następstwem zakażenia wirusowego lub odpowiedzi cytotoksycznej (antygen VCA). Antygen wczesny nie stanowi składowej wirionu, lecz występuje w komórkach, w których dochodzi do aktywnej replikacji HHV-4. Przeciwciała przeciwko antygenowi wczesnemu towarzyszą najczęściej przeciwciałom przeciw VCA, jednak wykrywane są znacznie rzadziej. Bardzo rzadkie sytuacje, w których dochodzi do syntezy izolowanych przeciwciał przeciw antygenowi wczesnemu (bez towarzyszących przeciwciał anty-VCA), mogą wskazywać na zakażenie, w którym mimo pojawienia się populacji komórek zakażonych wirusem nie dochodzi do tworzenia dużej liczby wirionów potomnych (zakażenie poronne lub persystentne). Antygen jądrowy jest wielofunkcyjnym białkiem EBV występującym w komórkach zakażonych latentnie, odpowiada za utrzymanie episomalnej formy genomu EBV, bierze udział w regulacji transkrypcji białek związanych z reaktywacją oraz jest jedynym białkiem wirusa wykrywanym we wszystkich poznanych typach nowotworów związanych z HHV-4. Masywna prezentacja tego antygeny komórkom układu immunologicznego ma miejsce w przypadku śmierci limfocytów proliferu-

jących, nowotworów o podłożu EBV oraz komórek zakażonych latentną formą wirusa.

W większości przypadków wykrycie obecności przeciwciał przeciwko VCA w klasie IgM testem jakościowym wystarcza do prawidłowego zdiagnozowania pierwotnego zakażenia EBV. Okres wylegania choroby jest długi, dlatego przeciwciała te są obecne u 95% chorych już w chwili wystąpienia objawów. Wysokie miano VCA IgM utrzymuje się od 1 do 6 tygodni, po czym zaczyna maleć, aby osiągnąć poziom odpowiadający wynikowi ujemnemu po 1 do 6 miesiącach (21). VCA IgG u dzieci pojawiają się nawet po kilku miesiącach od wystąpienia VCA IgM, co oznacza, że wykrycie samych przeciwciał VCA IgM nie wystarcza do odróżnienia infekcji niedawno przebytej od odległej w czasie (7). Wykrycie VCA IgG, którym nie towarzyszą przeciwciała w klasie IgM, świadczy o przebytych zakażeniu, a u osób immunokompetentnych – o odporności. Przeciwciała przeciwko antygenowi wczesnemu są obecne u 20-80% pacjentów. Istnieją dwa rodzaje antygenu wczesnego: EA-D i EA-R. Antygen EA-D (*diffuse*) występuje zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Przeciwciała klasy IgG przeciwko EA-D pojawiają się 3-4 tygodnie i zanikają po 3-4 miesiącach od wystąpienia objawów (28). Wysoki poziom tych przeciwciał obserwuje się niekiedy w przypadku reaktywacji zakażenia latentnego. Pewien odsetek ludzi (5-40%) nie syntetyzuje przeciwciał przeciw EA-D mimo oczywistego zakażenia EBV. Drugi typ antygenu wczesnego, EA-R (*restricted*), znajduje się tylko w cytoplazmie zakażonych komórek. Przeciwciała przeciwko EA-R są charakterystyczne dla reaktywacji zakażenia, wykrywa się je także u dzieci poniżej 2. roku życia w przypadku infekcji skąpoobjawowych (7, 28). Przeciwciała klasy IgM skierowane przeciwko EBNA pojawiają się jako ostatnie, czyli po około 4-6 tygodniach od wystąpienia objawów klinicznych. Jeśli wykrywane są na wczesnym etapie choroby, to należy wykluczyć zakażenie pierwotne EBV. Przeciwciała klasy IgG przeciwko EBNA utrzymują się przez wiele lat i są nawet bardziej miarodajnym wskaźnikiem przebytej infekcji niż VCA IgG (12, 28). Nagły wzrost miana EBNA IgM u osoby, która przebyła zakażenie EBV w przeszłości, może świadczyć o toczącym się procesie nowotworowym o podłożu HHV-4.

Metody molekularne

Metody wykorzystujące wykrywanie materiału genetycznego wirusa są stosowane rzadko w rutynowej diagnostyce mononukleozy zakaźnej. Badania te są wykonywane u pacjentów, u których diagnostyka serologiczna zawodzi. Najważniejsze sytuacje, w których diagnostyka serologiczna może okazać się nieskuteczna lub wymaga uzupełnienia metodami służącymi do wykrywania materiału genetycznego wirusa, to:

- zakażenie noworodków lub niemowląt (obecność swoistych przeciwciał pochodzących od matki),
- wysokie dawki leków immunosupresyjnych u biorców przeszczepów, wpływające na poziom syntezy przeciwciał,

- diagnostyka różnicowa w przypadku chorób rozrostowych komórek układu limfoidalnego (zwłaszcza limfocytów B),
- nietypowe formy zakażeń EBV (poprzeszczepowa choroba limfoproliferacyjna, chroniczne aktywne zakażenie EBV, przewlekły lub nawracający zespół podobny do mononukleozy u dorosłych, zapalenie wątroby oraz zespół hematofagocytozy).

Należy podkreślić, że zasadnicza większość opisanych powyżej sytuacji odnosi się do zakażeń wynikających z reaktywacji latentnej formy wirusa. W kontekście zakażeń pierwotnych wykazano natomiast, że istnieje silna korelacja pomiędzy wynikami badań uzyskanych metodami serologicznymi a metodami wykrywającymi materiał genetyczny wirusa w ostrej fazie mononukleozy zakaźnej, przy czym poziom DNAemii EBV jest wtedy z reguły wysoki. Standardową techniką wykorzystywaną obecnie do jakościowego oraz ilościowego wykrywania DNA EBV jest PCR z detekcją w czasie rzeczywistym, który w wariacie wykorzystującym sondy znakowane fluorescencyjnie odznacza się wysoką czułością i swoistością (22). Techniki biologii molekularnej mogą okazać się przydatne przy niedoborach odporności, w których pierwotne zakażenie EBV może mieć ciężki przebieg. Choroba Duncana, zespół Wiskotta-Aldricha oraz zespół ataksja-teleangiektazja to najczęstsze niedobory odporności związane z ryzykiem ciężkiego przebiegu pierwotnego zakażenia EBV. W przypadku chorób, którym towarzyszą niedobory funkcjonalne limfocytów, nie można oprzeć diagnostyki wyłącznie na wynikach badań serologicznych. W tej sytuacji, użytecznym narzędziem diagnostycznym może okazać się ilościowe oznaczenie materiału genetycznego wirusa (23). Zakażenia EBV są także poważnym problemem u biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych. Ze względu na przyjmowane leki immunosupresyjne, wynik badań serologicznych może być trudny w ocenie, natomiast wykrycie DNA wirusa we krwi jednoznacznie wskazuje na toczące się zakażenie (24).

Proces przedanalizacyjny

Oprócz metod i zakresu badań pomocnych w diagnozowaniu zakażeń EBV, niezwykle ważna jest wiarygodność wyników. W przypadku pacjentów pediatrycznych, problematyczne może być uzyskanie materiału do badania na czczo, pozyskanie niezbędnej ilości krwi oraz samo pobranie materiału. Sama technika pobrania krwi może wpływać na jakość uzyskanych wyników; należy liczyć się ze zwiększonym poziomem stresu pacjenta, związanym z lękiem przed bolesną procedurą. Długotrwały płacz oraz związany z tym stres i wysiłek mogą doprowadzić do wystąpienia przejściowej leukocytozy (29). Do innych czynników mogących skutkować podwyższeniem poziomu leukocytów należą: pora dnia, rodzaj spożytego posiłku oraz leki przyjmowane przez dziecko. Poprawne pobranie krwi obwodowej u pacjenta pediatrycznego wiąże się z szeregiem trudności. Wydłużenie czasu potrzebnego na znalezienie odpowiedniego naczynia krwionośnego i na samo pobranie próbki krwi oraz zbyt długie

utrzymanie opaski uciskowej mogą prowadzić do rozrzedzenia elementów morfotycznych krwi, zmniejszenia liczby płytek oraz do lizy erytrocytów. Wszystko to sprawia, że diagnostyka laboratoryjna zakażeń EBV u małych dzieci może okazać się wyzwaniem.

PODSUMOWANIE

Diagnostyka mononukleozy zakaźnej wykonywana jest u osób, które prezentują cały wachlarz objawów, takich jak długotrwała podwyższona ciepłota ciała, limfadenopatie, zapalenie gardła, zapalenie spojówek oraz biegunka. W początkowej fazie choroby nie sposób odróżnić zakażenia EBV od innych chorób gorączkowych. Objawy mononukleozy pojawiają się kolejno, co dodatkowo komplikuje rozpoznanie. W praktyce, w rutynowej diagnostyce chorób gorączkowych pediatrzy zlecają często wykonanie najtańszego badania morfologii krwi bez rozmazu mikroskopowego i oznaczenia poziomu CRP. Możliwości zautomatyzowanych aparatów hematologicznych są duże, a pojawienie się limfocytów atypowych powinno skutkować odpowiednią informacją (flagi), jednak badanie takie nie może zastąpić mikroskopowego rozmazu krwi ocenianego przez doświadczoną diagnostę. Zważywszy, że powiększenie węzłów chłonnych i hepatosplenomegalia mogą wystąpić w przebiegu innych chorób, rezygnacja z różnicowania mikroskopowego może mieć poważne konsekwencje. Rolą diagnosty powinno być zasugerowanie

wykonania rozmazu w każdej sytuacji budzącej wątpliwości.

Standardowy zestaw badań laboratoryjnych przy podejrzeniu mononukleozy zakaźnej powinien obejmować: morfologię krwi z rozmazem ocenianym mikroskopowo, badanie poziomu CRP, ocenę aktywności transaminaz oraz wykrywanie przeciwciał heterofilnych. Najczęstszą przyczyną braku oczekiwanych wyników jest pojedyncze badanie, wykonane zbyt wcześnie w przebiegu zakażenia. Ważna jest także informacja o chorobach współistniejących oraz przyjmowanych przez chorego lekach. W przypadku stwierdzenia zaburzeń w obrazie hematologicznym mogących wskazywać na mononukleozę zakaźną lub wykrycia limfocytów atypowych, warto pamiętać o wykonaniu diagnostyki różnicowej w kierunku zakażeń CMV, HIV lub HHV-6. W sytuacjach niejasnych należy oprzeć się na wynikach swoistych badań serologicznych, a w przypadku gdy nie dadzą one jednoznacznej odpowiedzi – na wynikach badania DNA EBV we krwi. Jednakże z naszych doświadczeń wynika, że w ramach POZ badania takie zlecane są niechętnie i najczęściej sprowadzają się do wykrycia VCA IgM. W większości wypadków jest to wystarczające, lecz należy mieć na uwadze sytuacje, w których przeciwciała te, utrzymujące się nawet do pół roku po zakażeniu pierwotnym HHV-4, mogą zostać wykryte przy okazji choroby gorączkowej o innej etiologii.

PIŚMIENNICTWO

- Arvin A, Fiume GC, Mocarski E et al.: Human Herpes Viruses, Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge University Press, New York 2007: 341-378.
- Acheson NH: Fundamentals of molecular virology. John Wiley & Sons, Hoboken 2007: 134-146.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1964; 28; 1(7335): 702-703.
- Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM: Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* 1965; 1; 121: 761-770.
- De-The G, Gesser A, Day NE et al.: Epidemiological evidence for casual relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 1978; 24; 274(5673): 756-761.
- Henle G, Henle W, Diehl V: Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci* 1968; 59(1): 94-101.
- Jenson HB: Epstein-Barr Virus. *Pediatrics in Review* 2011; 32: 375-384.
- Turk SM, Liudmila RJ, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM: Antibodies to gp350/220 Enhance the Ability of Epstein-Barr Virus To Infect Epithelial Cells. *Journal of Virology* 2006; 80(19): 9628-9633.
- Lowe-Shannon C, Adland E, Bell AI et al.: Features Distinguishing Epstein-Barr Virus Infection of Epithelial Cells and B Cells: Viral Genome Expression, Genome Maintenance, and Genome Amplification. *Journal of Virology* 2009; 83(15): 7749-7760.
- Lowe-Shannon C, Rowe M: Epstein-Barr Virus Infection of Polarized Epithelial Cells via Basolateral Surface by Memory B Cell-Mediated Transfer Infection. *Plos Pathogen* 2011; 7(5): e1001338. doi: 10.1371/journal.ppat.1001338.
- Hurt-Fletcher L, Chesnokova L: Integrins as triggers of Epstein-Barr virus fusion and epithelial cell infection. *Landes Bioscience (Virulence)* 2011; 1(5): 395-398.
- Greer JP, Arber DA, Glader B et al.: Wintrobe's Clinical Hematology. Wolters Kluwer/Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia 2014: 1324-1341.
- Nalesnik MA, Starzl T: Epstein-Barr Virus, Infectious Mononucleosis, and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders. *Transplant Sci* 1994; 4(1): 61-79.
- Crawford DH: Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356: 461-473.
- Luzuriaga K, Sulliva JL: Infectious Mononucleosis. *N Engl J Med* 2010; 362: 1993-2000.
- Klein E, Emberg I, Masucci MG et al.: T-Cell Response to B-Cells and Epstein-Barr Virus Antigens in Infectious Mononucleosis. *Cancer Res* 1981; 41: 4210-4215.
- Long HM, Taylor GS, Rickinson AB: Immune defence against EBV and EBV-associated disease. *Current Opinion in Immunology* 2011; 23: 258-264.
- Woodberry T, Suscovich TJ, Henry LM et al.: Differential Targeting and Shifts in the Immunodominance of Epstein-Barr Virus-Specific CD8 and CD4 T Cell Responses during Acute and Persistent Infection. *JID* 2005; 192: 1513-1524.
- Macswen KF, Crawford DH: Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet* 2003; 3: 131-140.
- Ebell MH: Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis. *AFP* 2004; 70(7): 1279-1287.
- Wallach J: Choroby zakaźne. [W:] Wallach J: Interpretacja badań laboratoryjnych. Medipage, Warszawa 2011: 1151-1154.
- Chan K, Ng MH, Seto WH, Peiris JSM: Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in Sera of Patients with Primary EBV Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(11): 4152-4154.
- Miyawaki T: Primary Immunodeficiencies Inducing EBV-Associated Severe Illnesses. *Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology* 2004; 3(2): 51-57.
- Omar H, Hägglund H, Gustafsson-Jernberg A et al.: Targeted monitoring of patients at high risk of posttransplant lymphoproliferative disease. *Traspl Infect Dis* 2009 Oct; 11(5): 393-399.
- Krzemińska-Ławkowiczowa I, Maj S: Atlas hematologii klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1993: 80.
- Ławkowicz W, Krzemińska-Ławkowiczowa I: Atlas hematologiczny. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1956: 168-174.
- Beer MH, Berkow R: The Merc Manual, Podręcznik Diagnostyki i Terapii. Urban & Partner, Wrocław 2001: 2755-2759.
- Paschale MD, Clerici P: Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J VIROL* 2012; 12(1): 31-43.
- Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B: Próbkę: od pacjenta do laboratorium. MedPharm, Wrocław: 7-27.