Dijagnostika infektivne mononukleoze

Ninić, Nino

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:038872

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO-LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nino Ninić

DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNE MONONUKLEOZE

Završni rad

Split, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO-LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nino Ninić

DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNE MONONUKLEOZE

DIAGNOSTIC OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Završni rad / Bachelor's thesis

Mentor:
doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr.med.
spec. medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Split, 2019.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Virusi i njihova osnovna građa 2

1.2. Umnažanje virusa 3

1.3. Univerzalni sustav virusne taksonomije 4

2. UZROČNICI INFEKTIVNE MONONUKLEOZE 5

2.1. Epstein-Barr virus (EBV) 6

2.1.1. Fiziologija i struktura, replikacija 6

2.1.2. Epidemiologija 7

2.1.3. Prijenos i patogeneza 8

2.1.4. Klinička slika 8

2.1.5. Liječenje i prevencija 11

2.2. Citomegalovirus (CMV) 12

2.2.1. Fiziologija i struktura, replikacija 12

2.2.2. Epidemiologija 13

2.2.3. Prijenos i patogeneza 13

2.2.4. Klinička slika 14

2.2.5. Liječenje i prevencija 16

3. DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNE MONONUKLEOZE 17

3.1. Serološka dijagnostika 18

3.1.1. Antigeni 19

3.1.2. Protutijela 20

3.1.3. Metode u neizravnoj dijagnostici 23

3.2. Dijagnostika Epstein-Barr virusa 27

3.3. Dijagnostika Citomegalovirusa 29

4. CILJ RADA 30
5. METODE 31
5.1. Uzorkovanje 31
5.2. Dijagnostika ELFA metodom 35
6. REZULTATI 40
6.1. Interpretacija nalaza 41
6. ZAKLJUČAK 42
7. SAŽETAK 43
8. ABSTRACT 44
9. LITERATURA 45
10. ŽIVOTOPIS 47

1. UVOD

Infektivna mononukleoza je zarazna bolest retikuloendotelnog i limfnog sustava, virusne etiologije. Prvi put ju je opisao Pfeiffer u 19. stoljeću (1889.). Ova bolest je bila poznata kao „*Drüsenfieber*“ (žljezdana groznica) i pojavljivala se u obiteljskim epidemijama. Turk je 1907. opisao hematološke promjene smatrajući isprva da se radi o slučaju akutne limfadenoze. Naziv infektivna mononukleoza dobila je po karakterističnim promjenama u bijeloj krvnoj slici (krvna slika leukocita) što su uočili 1920. Sprunt i Evans. Godinu kasnije Tidy i Morley upozoravaju da su žljezdana groznica i infektivna mononukleoza identične bolesti. Paul i Bunnell 1932. godine otkrili su pojavu heterofilnih protutijela u serumu bolesnika. Epstein-Barr virus su otkrili 1964. godine znanstvenici Epstein, Achong i Barr, elektronskim mikroskopom u staničnoj kulturi limfoblasta dobivenih iz tkiva bolesnika oboljelog od Burkittova limfoma.

Bolest je karakterizirana umorom, vrućicom, faringitisom, nelagodom, hepatosplenomegalijom, limfoadenopatijom i probavnim neugodnostima. Infektivna mononukleoza ima blagi tijek bolesti. Iznimno je rijetka pojava teških komplikacija kao što su ruptura slezene i teža oštećenja središnjeg živčanog sustava i smrtnog ishoda bolesti te zbog svega toga ona nema osobitu značajnost u ukupnom morbiditetu i mortalitetu od zaraznih bolesti.



Slika 1. Faringitis

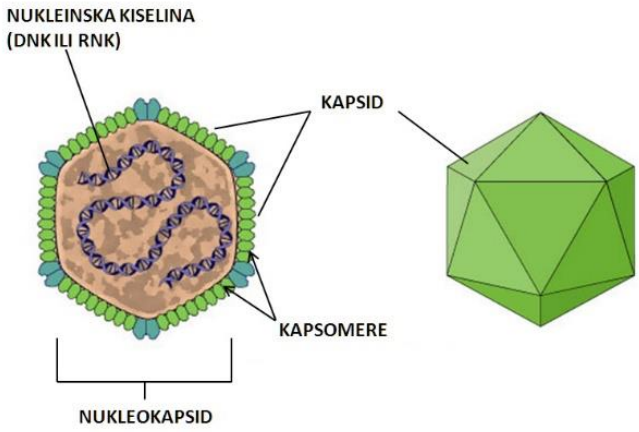


Slika 2. Limfadenopatija(svet-biologije.com)

1.1. Virusi i njihova osnovna građa

Virusi su najmanji infektivni agensi (od 20 do 400 nm) i odgovorni su za virusne infekcije kod ljudi i životinja. Virusi su toliko mali da bi, usporedbe radi, više od 2000 virusa moglo stati u jednu prosječnu bakterijsku stanicu te više od 50 milijuna u prosječnu ljudsku stanicu. Virusi su inertni u izvanstaničnoj sredini što znači da se umnožavaju unutar stanica viših organizama služeći se većim ili manjim dijelom staničnim metabolizmom domaćina. Svijet virusa je raznolik, razlikuju se po strukturi, organizaciji i ekspresiji genoma te strategijama umnožavanja i prijenosa. Raspon domaćina pojedinog virusa može biti širok, ali i vrlo ograničen. Evolucijsko podrijetlo virusa nije poznato, smatra se da su virusi nastali iz dijelova DNK ili RNK stanice domaćina koji su postali sposobni samostalno se umnožavati i razvijati.

Središnji dio virusa je **jezgra**, građena od **nukleinske kiseline.** Virusi sadržavaju samo jednu nukleinsku kiselinu (DNK ili RNK) Jezgru obavija proteinski omotač ili **kapsida**. Ona čuva virusni genom od djelovanja nukleaza, pomaže pri prijenosu nukleinskih kiselina među stanicama i nosilac je virusnih antigena. Kapsida je građena od proteinskih molekula koje tvore strukturne podjedinice (protomere). Više strukturnih podjedinica čine kuglaste ili prizmatične morfološke podjedinice, tzv. kapsomere. Jezgra i kapsida čine **nukleokapsidu virusa**. Virusi jednostavne građe sadrže samo nukleokapsidu, dok virusi složenije građe sadrže proteinski matriks oko nukleokapside te **lipidnu ovojnicu** na kojoj se nalaze **glikoproteinski izdanci** koji služe za prianjanje virusa i kao antigeni.



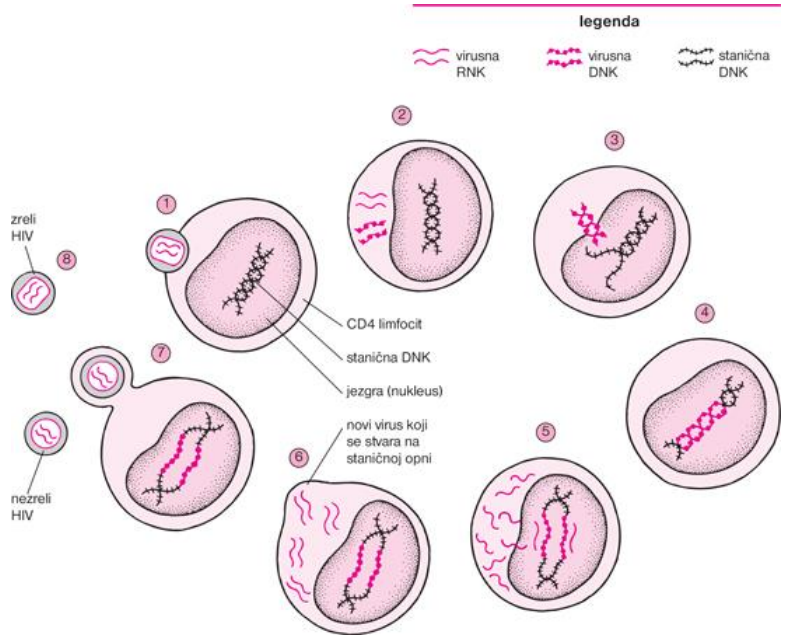
Slika 3. Građa virusa(svet-biologije.com)

1.2. Umnožavanje virusa

Umnožavanje virusa teče određenim slijedom koji se mogu svrstati u nekoliko faza. Replikacijski ciklus se dijeli na ranu i kasnu fazu. Virusi, zbog toga što se mogu umnožavati samo u živim stanicama, koriste stanični metabolizam domaćina, njegovu energiju, sintetski aparat i prekursore male molekulske mase potrebne za sintezu virusnih proteina i nukleinskih kiselina.

Prvi korak je prepoznavanje ciljne stanice i adsorpcija virusa na stanicu. Adsorpcija se zbiva specifičnim vezanjem virusnih antigena smještenih na površini virusa s receptorima na površini stanice. Nakon adsorpcije virusa na stanicu slijedi njegovo prodiranje unutar stanice. Prodiranje traje od nekoliko minuta do nekoliko sati. Virusi mogu ući u stanicu postupkom endocitoze. Endocitoza je „ingestija“ endocitne vrećice ispunjene virusom.

Virus se potom prenosi u citoplazmu. Nukleinska kiselina unutar kapside nije aktivna. Potrebno ju je dopremiti do mjesta umnožavanja kako bi se virus mogao razmnožiti. Genom DNK virusa mora se dopremiti u staničnu jezgru, dok RNK virusi većinom ostaju u staničnoj citoplazmi.



Slika 4. Umnožavanje virusa(msd-priručnici.placebo.hr)

Potom kreće sinteza mRNK prepisivanjem s virusne DNK ili RNK pomoću staničnih polimeraza. Spajanjem mRNK na ribosome započinje prevođenje šifriranih nasljednih uputa u virusne proteine.

Ciklus umnožavanja virusa može trajati od 6 do 72 sata, ovisno o vrsti virusa. Nakon toga slijedi sastavljanje nove virusne čestice. Prvo nastaje prazna kapsida, tzv. prokapsida te se potom u njuubacujenovonastali virusni genom. Neki virusni proteini se nakon prevođenja dodatno mijenjaju procesima fosforilacije, glikozilacije i dr. Tijekom sastavljanja ponekad se tvore i defektni virusi. To su virusi bez virusnog genoma, odnosno, prazne kapside, koje na štetu infektivnih virusnih čestica umanjuju njihov broj. Na kraju novoformirani virusi nakon razmnožavanja izlaze iz stanice.

1.3. Univerzalni sustav virusne taksonomije

U svrhu što dosljednije klasifikacije virusa, Međunarodni odbor za taksonomijuvirusa (*International Committee on Taxonomy of viruses – ICTV)* osnovao je jedinstvenu bazu podataka koja sadržava popis i osnovna obilježja svih trenutačno priznatih virusa. Danas je općenito prihvaćen sustav prema kojem se virusi dijele na: porodice, potporodice, rodove i vrste, sve na temelju morfologije virusa, strukture genoma i strategije replikacije. Neke od porodica grupirane su i u redove, no grupiranje u više taksonomske skupine kao što su razredi ili koljena ne koristi se za viruse. Nazivi virusnih redova završavaju sufiksom -virales, porodice imaju nastavak -viridae, a potporodice -virinae. Unutar svake porodice nalaze se potkategorije nazvane rodovi i temelje se na biološkim, genomskim, fizikalnim ili serološkim razlikama. Imena rodova imaju nastavak -virus.

2. UZROČNICI INFEKTIVNE MONONUKLEOZE

Uzročnici infektivne mononukleoze su**Epstein-Barr virus (EBV)** i **Citomegalovirus (CMV)**.Procjenjuje se da je uzrok sindroma mononukleoze u 90 % slučajeva EBV, a u 5–7 % CMV.

Oni pripadaju porodici *Herpesviridae*. Herpesvirusi se dijele u tri potporodice:

- *Alphaherpesvirinae,*
- *Betaherpesvirinae*
- *Gammaherpesvirinae*

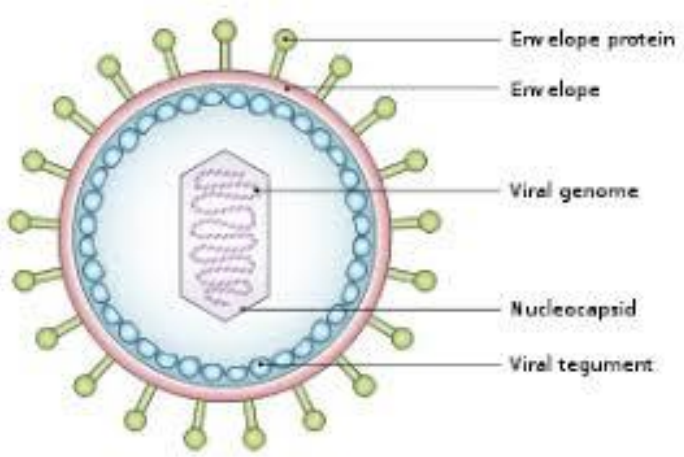
U medicini se označavaju akronimom HHV (humani herpes virus). Epstein-Barr virus nosi akronim HHV4, a citomegalovirus HHV5.

Virusi porodice *Herpesviridae* su kuglasta oblika, promjera 150-200 nm; nukleokapsida ima oblik ikozaedra sa 162 kapsomere. Genom čini dvolančana linearna molekula DNK veličine 125-240 kbp. Ovojnica im potječe od jezgrine ovojnice stanice domaćina i sadržava virusne glikoproteine i Fc-receptore.

Najvažnije svojstvo ovih virusa je što uzrokuju doživotne (perzistentne) infekcije s povremenim razdobljima reaktivacije. Bolesti se mogu pojaviti u rasponu od klinički neopaženih pa sve do zloćudnih tumora.

2.1. Epstein-Barr virus (EBV)

Epstein-Barr virus (EBV; HHV4) je humani herpesvirus iz obitelji *Herpesviridae*, potporodice *Gammaherpesvirinae*, roda *Lymphocryptovirus* koji uzrokuje infektivnu mononukleozu, karcinom nazofarinksa, Burkittov limfom, Hodgkin-ov i non-Hodgkinov limfom te ostale limfoproliferativne poremećaje u imunodeficijentnih osoba.



Slika 5. Građa Epstein-Barr virusa(en.wikipedia.org)

2.1.1. Fiziologija i struktura, replikacija

EBV je obavijeni virus s dvostruko zavijenom DNK koja sadrži 172 kbp te kodira približno 100 gena. Poznata su dva glavna tipa: tip A i tip B. Ciljno mjesto EBV-a su limfociti B. Virus se veže za receptor koji je ujedno receptor za C3d komponente komplementa. Kad virus uđe u limfocite, prelazi u fazu latencije bez prethodnog ciklusa umnožavanja virusa. Glavna obilježja EBV-a su sljedeća: **virusna perzistencija, ograničen virusni izražaj, mogućnost reaktivacije te litička replikacija.** Prekid faze latencije i poticanje genoma na replikaciju događa se kada se dogodi određeni podražaj, npr. podražaj nekom kemijskom tvari će dovesti do aktivacije EBV-a i početka replikacije u epitelnim stanicama orofarinksa, parotidnoj žlijezdi, vratu maternice ili u epitelnim stanicama nazofaringealnog karcinoma.

Spajanje virusa s površinom stanice može pokrenuti stanični ciklus. Tada određeni virusni geni budu izraženi i stanice se započnu beskonačno dijeliti. Limfociti B postaju besmrtni te počmu izlučivati imunoglobuline, aktivacijske produkte, Epstein-Barr nuklearne antigene, kasne membranske proteine i male RNK.

EBV antigeni dijele se u tri skupine:

1. **rani antigeni** – nestrukturni proteini, sinteza im ne ovisi o replikaciji virusne DNK, upućuju na početak produktivne virusne replikacije

2. **kasni antigeni** – strukturni proteini virusne ovojnice (glikoproteini) i kapside (virusni kapsidni antigen), upućuju na produktivnu virusnu infekciju

3. **antigeni latentne faze** – sinteza u latentno inficiranim stanicama, EBNA i LMP upućuju na prisutnost virusnoga genoma

Epstein-Barr virus je visokospecifičan za ljude.

2.1.2. Epidemiologija

EBV uzrokuje infekcije diljem svijeta. U zemljama u razvoju, infekcije se događaju u ranome djetinjstvu (< 6 godina), prolaze neopaženo i stvaraju trajnu imunost prema infektivnoj mononukleozi. U industrijaliziranim zemljama ,više od 50% infekcija nastaje u kasnoj adolescenciji ili u ranoj odrasloj dobi i očituje se kliničkom slikom infektivne mononukleoze. Prema procjenama, u SAD-u je incidencija infektivne mononukleoze 100.000 slučajeva godišnje (4). U Hrvatskoj se infektivna mononukleoza sve češće pojavljuje, no godišnji prijavljeni broj slučajeva bolesti iznimno je mali. Podaci iz 2016. godine otkrivaju da su zabilježene 1864 osobe s infektivnom mononukleozom (14).

Osim sporadično, infektivna mononukleoza se pojavljuje u obliku proljetnih i jesenskih epidemija, posebice u kolektivima kao što su internati, studentski domovi i slično.

2.1.3. Prijenos i patogeneza

Primarna infekcija počinje u orofarinksu budući da se virus prenosidirektnim oralno-faringealnim kontaktom, odnosno, zaraženom slinom. Zbog ovakvog puta prijenosa u narodu je poznata kao „bolest poljupca“. Umnožavanje virusa započinje u epitelnim stanicama ili limfocitima B ždrijela i žlijezda slinovnica. Zaraženi B limfociti se dalje šire po organizmu. Većina zaraženih osoba izlučuje male količine virusa tjednima ili mjesecima nakon infekcije. U većine imunokompetentnih osoba zaražene stanice budu odstranjene, ali ipak vrlo mali broj stanica ostaje trajno inficiran (1 od 10^5 - 10^6 limfocita B). Latentna EBV-infekcija zdravih darovatelja krvi i organa može predstavljati potencijalni put prijenosa. Moguć je prijenos putem transplantiranog organa prvenstveno u prethodno seronegativnog primatelja i rizični je čimbenik za posttransplantacijsku limfoproliferativnu bolest.

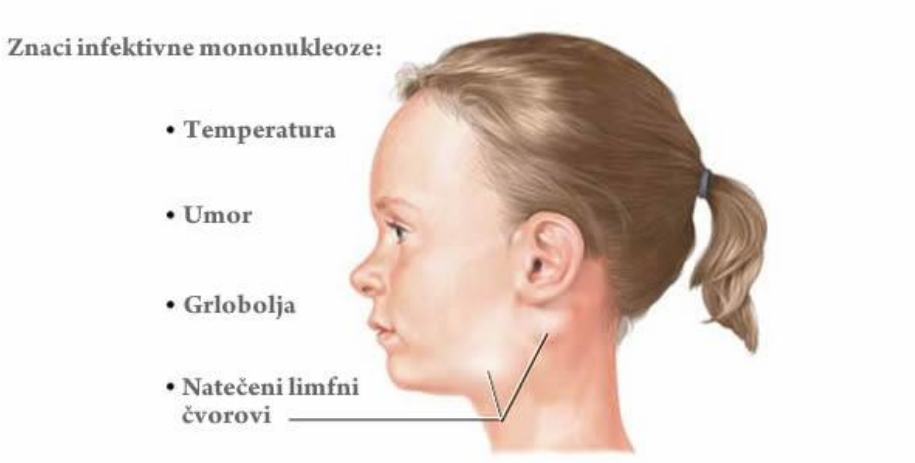
Primarne infekcije u djece većinom prolaze neopaženo tj. asimptomatski ili su povezane s nespecifičnim simptomima, dok se u adolescenata obično klinički očituju kao akutna infektivna mononukleoza (poliklonalna stimulacija limfocita) koja je obilježena jakim humoralnim i staničnim imunosnim odgovorom. Reaktivacija latentne infekcije EBV-om obično prolazi klinički neopaženo, osim u imunosuprimiranih bolesnika u kojih može imati teške posljedice.

2.1.4. Klinička slika

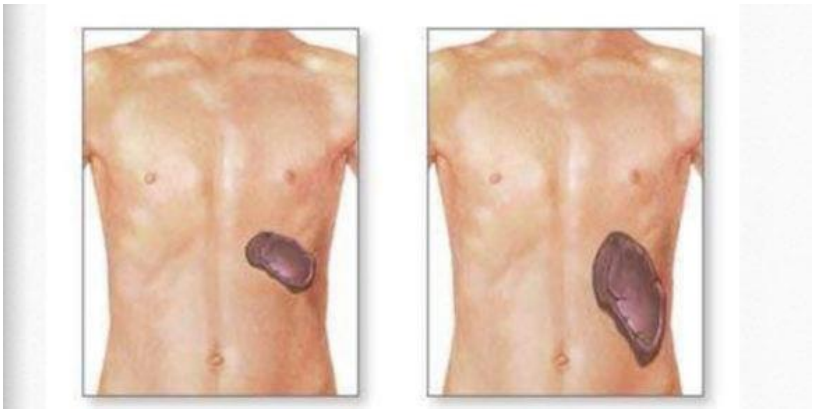
Epstein-Barr virus uzrokuje infektivnu mononukleozu, Hodgkinov i non-Hodgkinov limfom, Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom te poslijetransplantacijsku limfoproliferativnu bolest. Infekcija s EBV-om subklinička je u ranom djetinjstvu. Najčešće se klinička mononukleoze javlja za vrijeme adolescencije ili u ranoj odrasloj dobi. Broj leukocita može se popeti i do 80.000 u mm^3 krvi.

Infektivna mononukleoza

Nakon 2-3 tjedna, koliko traje inkubacija virusa, mogu se pojaviti nespecifični simptomi kao što su glavobolja, umor, slabost, povišena tjelesna temperatura. Temperatura se kreće od 38 do 40ºC, prosječno traje tjedan dana. Bol u ždrijelu uočljiv je simptom koji se javlja na početku bolesti i traje oko tjedan dana.Javljaju se i povećani limfni čvorovi te povećana slezena, a u nekih bolesnika i znakovi hepatitisa. Tijekom bolesti, koja obično traje 2-4 tjedna, u krvnoj slici se može vidjeti povećan broj bijelih krvnih stanica, pogotovo limfocita (velikih atipičnih limfocita T). Slabo povišena temperatura i slabost mogu trajati tjednima i mjesecima nakon akutne bolesti.



Slika 6. Znakovi infektivne mononukleoze(poliklinika-irac.ba)



Slika 7. Normalna i povećana slezena(krenizdravo.rtl.hr)

Hodgkinov i non-Hodgkinov limfom

Prisutnost EBV-a u 40 – 60% Reed-Sternbergovih stanica pokazuje povezanost između Hodgkinove bolesti i infektivne mononukleoze (4). Oboljeli od AIDS-a skloniji su razvoju EBV-u pridruženih limfoma. Često je na jeziku razvijena oralna vlasasta leukoplakija (mjesto replikacije EBV-a u epitelnim stanicama).

Burkittov limfom

Burkittov limfom je zloćudna bolest čeljusti i lica koja se pojavljuje endemski u djece i odraslih u Africi. Više od 90% afričkih tumora sadržava EBV DNK i EBNA1 antigen, za razliku od drugih dijelova svijeta, gdje je zastupljenost EBV DNK u tumorskom tkivu približno 20% (3).

Nazofaringealni karcinom

Nazofaringealni karcinom je zloćudna bolest epitelnih stanica nazofarinksa endemski prisutna u Kini. Smatra se da su genski i epigenetički čimbenici važni u nastanku ove bolesti. U tumorskim stanicama mogu se naći EBV DNK, EBNA1 i LMP1. Također se mogu otkriti visoke razine anti-EBV protutijela.

2.1.5. Liječenje i prevencija

Ne postoji učinkovit lijek protiv Epstein-Barr virusa. Liječenje je uglavnom simptomatsko, provodi se u kućnoj njezi.Više od 95% bolesnika s infektivnom mononukleozom spontano ozdravi i potrebno im je samo potporno liječenje (3). Najvažnije mjere su mirovanje, lagana hrana s dovoljno tekućine te izbjegavanje svih tjelesnih napora zbog opasnosti rupture slezene.

Antivirusni lijek aciklovir smanjuje količinu virusa koji se izlučuju iz orofarinksa, ali nema učinka na besmrtnost limfocita B.

Liječi se samo bakterijski uzrokovan faringitis koji je prethodno dokazan pozitivnim nalazom kulture.

Kortikosteroidi su izbor liječenja samo kod slučajeva zatvaranja dišnog puta zbog povećanih tonzila, trombocitopenije ili teške hemolitičke anemije.

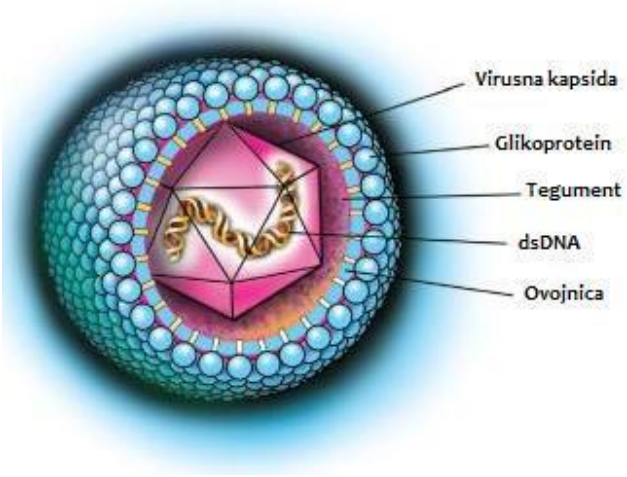
Velika su očekivanja u imunoterapiji EBV-u pridruženih limfoproliferativnih bolesti pomoću EBV specifičnih T-limfocita jer omogućuje rekonstrukciju imunosti specifične za EBV, kontrolu imunoproliferacije te uklanja znakove bolesti. Cjepivo protiv EBV-a je u postupku istraživanja.

2.2. Citomegalovirus (CMV)

Citomegalovirus (CMV; HHV5) je također humani herpesvirus iz porodice *Herpesviridae*. Pripada potporodici *Betaherpesvirinae* te rodu *Cytomegalovirus*. Citomegalovirus je najveći od svih herpesvirusa. Naziv je dobio po tome što se stanice inficirane CMV-om znatno povećaju što se naziva citomegalija, a smatra se da tome pridonosi tvorba velikih virusnih uklopina. Može uzrokovati neopažene, ali i klinički izražene infekcije, latentne i perzistentne (doživotne) te reaktivacije i reinfekcije.

2.2.1. Fiziologija i struktura, replikacija

Citomegalovirus ima najveću dvolančanu DNK od svih herpesvirusa, veličine 240 kbp, koja kodira približno 230 proteina. Mnogi od tih proteina su zaduženi za izbjegavanje imunosnog nadzora domaćina. Na taj način inficirane stanice budu neprepoznate i neodstranjene. Genom je smješten u nukleokapsidi oko koje se nalaze tzv. proteini matriksa ili tegumentum, koji obavija lipidna ovojnica. Tijekom umnožavanja, CMV stvara citopatični učinak (učinak gdje su mikroskopski vidljive promjene na stanici). Virus se umnožava u staničnoj jezgri u kojoj se mogu vidjeti velike inkluzije, odnosno, mjesta umnožavanja virusa. Osim tih inkluzija tipičnih za sve herpesviruse, stvaraju se i perinuklearne citoplazmatske inkluzije i multinuklearne stanice. Zbog toga inficirane stanice postanu citomegalične.



Slika 8. Građa Citomegalovirusa(docplayer.net)

2.2.2. Epidemiologija

CMV je proširen diljem svijeta. Infekcije se javljaju tijekom cijele godine. Prevalencija seropozitivnih osoba razlikuje se ovisno o životnim uvjetima, higijenskim navikama i dobi. Najviša je u djece i odraslih u zemljama u razvoju i u skupinama niskog socio-ekonomskog statusa u razvijenim zemljama. U Sjedinjenim Američkim Državamapozitivno je na CMV 40 – 80% djece, prvenstveno su zaražena putem majčinog mlijeka ili u jaslicama (4). Intrauterini prijenos se pojavljuje u oko 40% primarnih infekcija majke(3).U Republici Hrvatskoj prevalencija seropozitivnih osoba u općoj populaciji iznosi približno 80% dok u osoba na hemodijalizi prelazi 90%. Ljudi su jedini poznati izvor infekcija CMV-om (11).

2.2.3. Prijenos i patogeneza

Infekcija citomegalovirusom može se prenijeti oralnim i spolnim putem, transfuzijom krvi i krvnih pripravaka, transplacentarno, konatalno, te presadbom organa i koštane srži. Inkubacija traje 4-8 tjedana. Virus uzrokuje sustavne infekcije. Većina infekcija prođe neopaženo. Kao i kod EBV-a, zahvaljujući mehanizmu izbjegavanja imunosnog nadzora domaćina infekcija je perzistentna, tj. traje doživotno. Reaktivacije su česte u imunokompromitiranih bolesnika.

CMV se širi od stanice do stanice u prisutnosti protutijela. U napadnutom domaćinu uzrokuje kratkotrajnu imunosupresiju, te nastaju latentne i perzistentne infekcije. Zbog povećanog broja supresorskih limfocita T tijekom primarne infekcije, poremećen je odnos CD4/CD8 limfocita. Reaktivacija latentne infekcije zbiva se i u prisutnosti protutijela. Moguć je prijenos transplacentarno. Prisutnost protutijela u majčinom mlijeku ne sprječava prijenos infekcije s majke na dijete, alisprječava razvoj teške bolesti. CMV inducira tvorbu atipičnih limfocita, ali ne i tvorbu heterofilnih protutijela. To je različito od infekcije EBV-om. Stoga je CMV uzročnik infektivne mononukleoze s negativnim heterofilnim protutijelima.

2.2.4. Klinička slika

CMV je specifičan za vrstu i ne može se prenijeti s ljudi na životinje i obratno. CMV uzrokuje ponajviše kongenitalne i konatalne infekcije, ali također i infekcije u starije djece i odraslih.

Kongenitalne i konatalne infekcije

Citomegalovirus je najčešći uzročnik konatalnih infekcija.Novorođenčad se može zaraziti:

- intrauterino transplacentarno (preko krvi),
- tijekom porođaja prolazom kroz inficirani porođajni kanal
- nakon rođenja putem majčinog mlijeka

Virus se može prenijeti *in utero* tijekom primarne i tijekom ponovljene infekcije majke. U trudnica zaraženih prije trudnoće, virus se može reaktivirati tijekom trudnoće i potom se izlučiti cervikalnim sekretom. Novorođenčad se inficirati tijekom porođaja.

Klinički se očituje kao žutica, hepatosplenomegalija, trombocitopenija, mikrocefalija, intrauterini zastoj rasta, hidrocefalus, intracerebralne kalcifikacije i retinitis.



Slika 9. Retinitis(docplayer.net)



Slika 10. Žutica djeteta(krenizdravo.rtl.hr)

Ako su djeca rođena zdrava i na vrijeme, a zaražena za vrijeme porođaja ili putem majčinog mlijeka, nema kliničkih znakova bolesti. Tek unutar 2 godine kod takve djece razvije se gubitak sluha i vida ili poremećaj mentalnog razvoja. Infekcije u trudnoći često prolaze neopaženo ili se očituju blagim simptomima mononukleoze.

Infekcije u starije djece i odraslih

Infekcije u starije djece i odraslih najčešće prolaze neopaženo ili katkad sa znakovima infektivne mononukleoze. CMV-omjeuzrokovano 20 – 50% slučajeva u kojima je dijagnosticirana infektivna mononukleoza (3). Bolest se razvija blago.

Klinički neopaženo može se razviti hepatitis. Otkrivena je i povezanost infekcije CMV-om s pojavom ponovnog sužavanja koronarnih arterija nakon izvedene koronarne angioplastike ili ugradnje stenta (restenoza) u razdoblju od 3-6 mjeseci.

Infekcije u imunokompromitiranih domaćina

Imunokompromitirani domaćini su primatelji presatka organa i koštane srži, osobe oboljele od zloćudne bolesti koje se liječe kemoterapijom ili oboljeli od AIDS-a. Najvažniji izvori zaraze su organi za presađivanje i transfuzije krvi. Primarne infekcije uzrokuju teži oblik bolesti. Tijekom presađivanja češća je reaktivacija upale od primarne infekcije. Obje infekcije uzrokuju visok pobol i smrtnost. Najčešća komplikacija jest upala pluća kod primatelja koštane srži; učestalost je i do 20% (3). CMV također pridonosi nastanku drugih komplikacija, razvoju ateroskleroze presatka nakon presadbe srca, reakciji odbacivanja nakon presadbe bubrega i nastanku leukopenije.

2.2.5. Liječenje i prevencija

Infekcija CMV-om u imunokompetentnih osoba ne zahtijeva specifično liječenje. Antivirusni lijekovi ganciklovir, foskarnet i cidofovir pokazali su se uspješnima u liječenju teških infekcija u imunosuprimiranih bolesnika, kao i za profilaktično davanje u seropozitivnih primatelja presatka koštane srži, za prevenciju reaktivacije.

Serološkim testiranjem davatelja i primatelja prije presadbe moguće je spriječiti prijenos CMV-a i razvoj primarne infekcije u seronegativnoga primatelja. Testiranje davatelja krvi i organa uvelike smanjuje mogućnost širenja virusa, poglavito pri transfuziji krvi novorođenčadi.

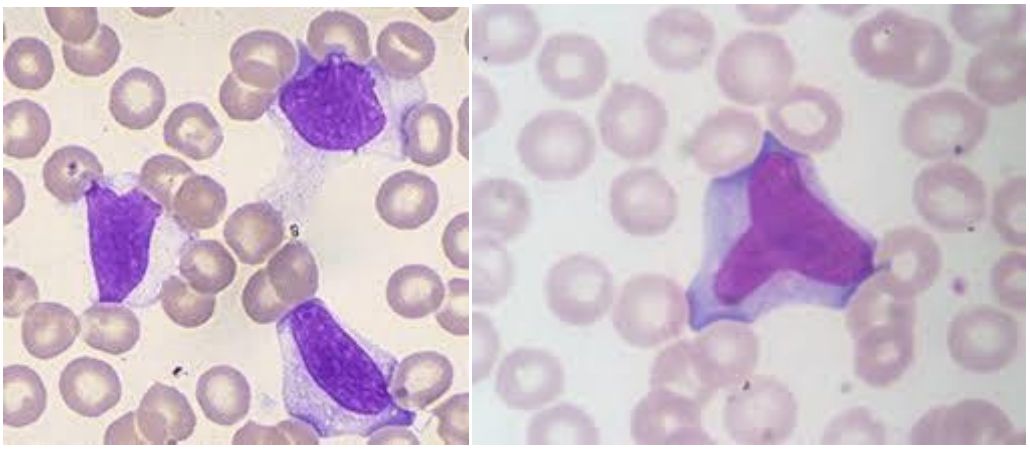
Konatalan prijenos virusa teško se može učinkovito spriječiti. Opće mjere zaštite od infekcije CMV-om obuhvaćaju upotrebu kondoma. Živa i rekombinantna cjepiva protiv CMV-a u postupku su istraživanja.

3. DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNE MONONUKLEOZE

EBV i CMV, kao uzročnici infektivne mononukleoze, dijagnosticiraju se najčešće **metodama neizravne dijagnostike**.

U vrijeme inkubacije rijetko je moguće detektirati uzročnika; u vrijeme pojave kliničkih simptoma uglavnom je moguće detektirati uzročnika, ali rijetko protutijela. U fazi oporavka opet je rijetko moguće detektirati uzročnika, ali zato je moguć dokaz protutijela.

Infektivna mononukleoza može se dijagnosticirati i pod mikroskopom diferencijalnom krvnom slikom u kojoj se u krvnom razmazu nalaze tzv. reaktivni limfociti. To su morfološki promijenjeni limfociti,mogu činiti i do 80% svih leukocita.



Slike 11. i 12. Reaktivni limfociti pod mikroskopom na krvnom razmazu

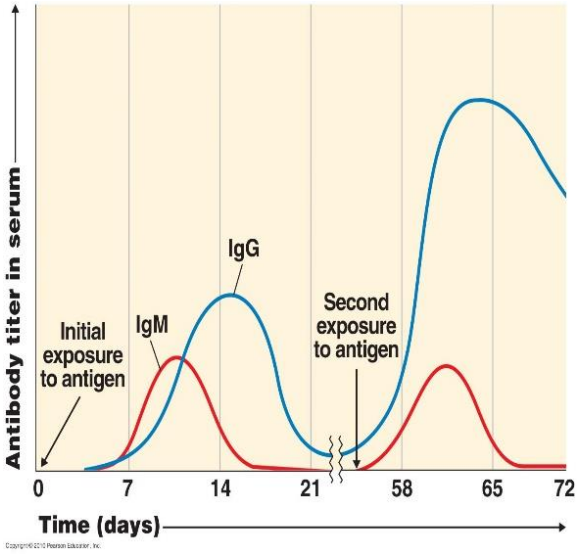
3.1. Serološka dijagnostika

Serološka dijagnostika**utvrđuje prisutnost specifičnih protutijela u serumu**. Primjenjuje se u dijagnostici virusnih infekcija, evaluaciji tijeka infekcije te za razlikovanje primarne, akutne, kronične i rekurentne infekcije, odnosno reinfekcije.

Rezultati i tumačenja seroloških nalaza virusne infekcije temelje se na dinamici tvorbe specifičnih protutijela (titar), zastupljenosti određenih klasa imunoglobulina, aviditeta IgG-protutijela te specifičnosti protutijela na ciljane virusne antigene.

Primarne virusne infekcije karakterizira promjena nalaza specifičnih protutijela u serumu bolesnika,od negativnog do pozitivnog. To se naziva serokonverzija.Utvrđivanjem pojedinih klasa imunoglobulina, može se utvrditi radi li se o akutnoj ili preboljenoj infekciji. Pojava IgM protutijela ukazuje na akutnu infekciju, a pojava IgG protutijela na preboljenu infekciju. Kod testova kod kojih ne možemo utvrditi klasu imunoglobulina,četverostruki ili viši porast titra protutijela između seruma uzetih u akutnoj fazi bolesti od seruma uzetih 2 do 4 tjedna kasnije ukazuje na akutnu infekciju.

Ponovne infekcije (reinfekcije) domaćina uzrokuju sekundarni odgovor koji je jači od primarnog, te takav odgovor štiti domaćina od ponovnog razvoja bolesti.



Slika 13. Primarni i sekundarni imunološki odgovor

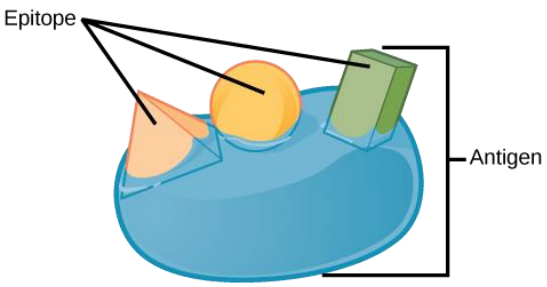
Serologija je korisna pri utvrđivanju imunosnoga statusa osoba osjetljivih na virusne infekcije (trudnice, bolesnici kojima se planira transplantacija organa ili tkiva) te osoba određenih zanimanja koje su izložene većem riziku za pojavu virusnih infekcija (zdravstveni i laboratorijski djelatnici).

Protutijela koja prva otkrivamo u serumu su većinom specifično usmjerena prema površinskim antigenima na stanici. U kasnijem tijeku infekcije, pojavom sve većeg broja stanica liziranih umnažanjem virusa, ili aktivnošću stanične imunosti, prisutna su protutijela specifična na unutarstanične virusne proteine i enzime.

3.1.1. Antigeni

Antigeni su složene molekule što ih imunosni sustav prepoznaje kao strane. Oni u organizmu potiču stvaranje protutijela na koja se vežu i izazivaju specifičnu staničnu i humoralnu imunoreakciju. No, protutijela ne prepoznaju cijelu molekulu nego samo jedan njezin dio, tzv. antigensku determinantu ili epitop. Epitop je mjesto na antigenu koje je specifično vezno mjesto samo za specifično protutijelo. Broj epitopa ovisi o veličini i složenosti molekule, a time je određena imunogeničnost (sposobnost molekule da potakne specifičnu humoralnu ili staničnu imunoreakciju, tj. stvaranje protutijela ili efektora specifične stanične imunosti).

Antigen se može unijeti u organizam prirodnim ili umjetnim putem. Prirodno najčešće ulazi kroz sluznicu dišnoga ili probavnoga sustava, ali može ući i kroz kožu, posteljicu ili izravno u krv. Umjetnim putem antigen se najčešće unosi uštrcavanjem u venu, mišić, u trbušnu šupljinu ili subkutano, ali i prilikom kirurškog zahvata, primjerice pri presadbi organa.



Slika 14. Antigen(pediaa.com)

3.1.2. Protutijela

Protutijela ili imunoglobulini su glikoproteini koje proizvode limfociti B.Građeni su od osnovne četverolančane jedinice koju nazivamo monomer. Monomer se sastoji od dvaju lakih i dvaju teških lanaca međusobno povezanima disulfidnim vezama.

Molekula ima oblik slova Y; sastoji se od dva istovrsna Fab fragmenta i jednog Fc fragmenta. **Fab fragment** je sastavljen od cijelog lakog i polovine teškog lanca te sadrži vezno mjesto za antigen koje se zove paratop. Ostatak teškog lanca čini Fc fragment koji određuje biološka svojstva pojedinih razreda imunoglobulina. Postoji pet razreda imunoglobulina, a to su: IgM, IgG, IgA, IgD i IgE. Najvažnija i najčešća protutijela u serumu čovjeka koja se određujuu neizravnoj dijagnostici su IgM i IgG protutijela.

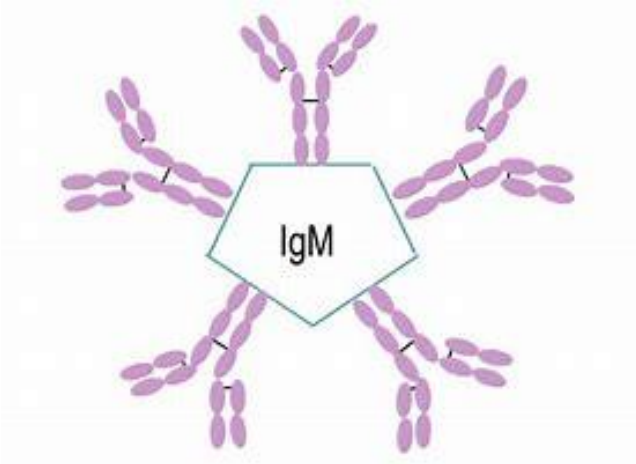
Protutijela na razne načine djeluju na antigene, a to su:

1. **Neutralizacija** u kojoj neutralizirajuća protutijela blokiraju dijelove površine bakterijske ili virusne stanice da bi njegov napad učinio neučinkovitim
2. **Aglutinizacija** u kojoj protutijela "lijepe zajedno" strane stanice u klupka koja su atraktivne mete za fagocitozu
3. **Precipitacija** u kojoj protutijela i antigeni čine precipitate koji su pogodni za fagocitozu
4. **Aktivacija komplementa** (fiksacija) u kojoj protutijela koja su uhvaćena na stranu stanicu potiču kaskadni sustav komplementa, što dovodi do: lize strane stanice i poticanje upale kemotaktičkim privlačenjem upalnih stanica

IgM protutijelo

IgM protutijelo je polimer koji se sastoji u izlučenom obliku od pet zvjezdoliko raspoređenih jedinica (monomera) dok jena površini B stanica monomer.Čine ga teški lanci μ i laki lanci κ ili λ. Eliminira patogene u ranim stadijima B-stanicama posredovanog (humoralnog) imuniteta prije nego što nastane dovoljna količina IgG-a.IgM je prvi imunoglobulin izražen u ljudskom fetusu (oko 20. tjedna).IgM protutijela se pojavljuju rano tijekom infekcije i obično se ponovno pojave, u manjoj mjeri, nakon sljedećeg izlaganja. IgM protutijela ne prolaze kroz ljudsku posteljicu te im poluživot u cirkulaciji krvi iznosi 5-10 dana.IgM se u normalnom serumu često veže na specifične antigene, čak i u odsutnosti prethodne imunizacije. Iz tog se razloga IgM ponekad zove "prirodno protutijelo".

Poliklonski porast prati akutna infektivna stanja (virusne, bakterijske i parazitarne infekcije), bolesti jetre, reumatoidni artritis… Snižene koncentracije se pojavljuju kod prirođenih imunodeficijentnih stanja.

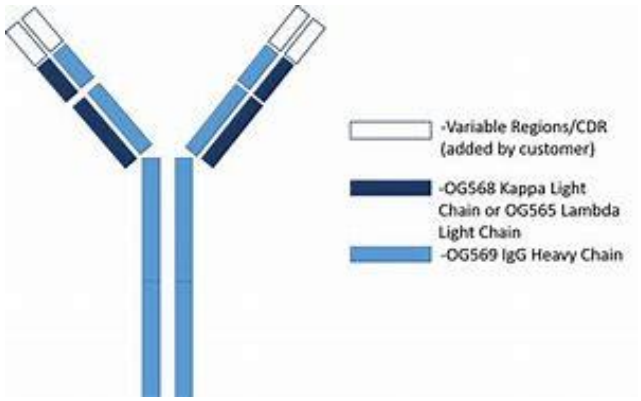


Slika 15. Građa IgM protutijela

IgG protutijelo

Imunoglobulin G (IgG) je najdominantniji imunoglobulinski razred. Pojavljuje se nakon 2 – 3 tjedna od početka infekcije. IgG protutijelopredstavlja približno 75% serumskih protutijela i ima najduži poluvijek života (23 dana). Prototipski monomer čine dva teška lanca γ i dva laka lanca κ ili λ. IgG protutijela stvaraju i otpuštaju plazmatske B stanice. IgG protutijelo je jedino koje ima mogućnost svladavanja posteljične barijere te time fetus već intrauterino sadrži pasivni imunitet. IgG protutijelo sadrži četiri subklase: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 koje se razlikuju po razdiobi lakih lanaca, broju disulfidnih veza, broju aminokiselina u zglobnoj regiji i sadržaju ugljikohidrata. IgG1 i IgG3 su najvažnije subklase protutijela jer ne samo da bolje prelaze posteljičnu barijeru već imaju najveći afinitet prema antigenima; ujedno IgG1 razred je i najbrojniji sa 60-65% udjela svih IgG protutijela.

Poliklonski porast IgG se nađe u sistemskom lupusu, kroničnim bolestima jetre, zaraznim bolestima i cističnoj fibrozi. Snižene koncentracije prate enteropatiju s gubitkom proteina, nefrotski sindrom te teške opekotine.



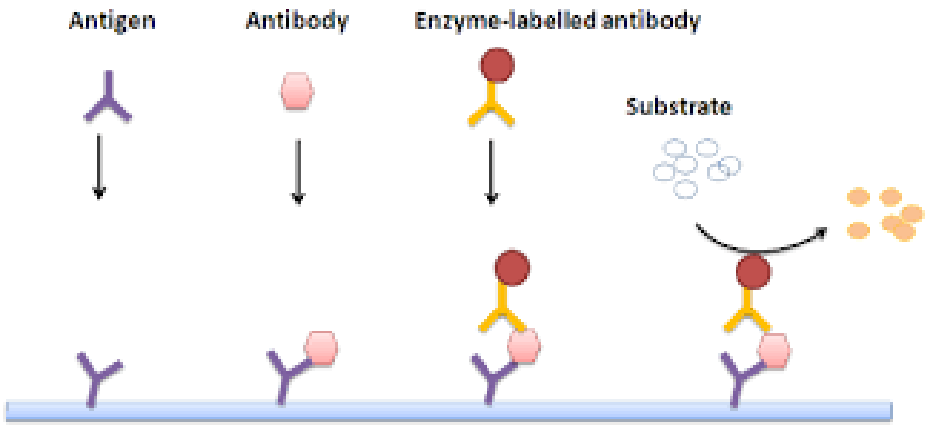
Slika 16. Građa IgG protutijela

3.1.3. Metode u neizravnoj dijagnostici

Najčešće metode korištene u neizravnoj dijagnostici su: neizravni imunoenzimski postupak (ELISA) te neizravni imunofluorescentni postupak (IFA). Također se koristi i Western blot, reakcija vezanja komplementa (RVK), aviditet specifičnih IgG-a, lateks aglutinacija i druge manje korištene metode. Odabir dijagnostičke metode ovisi o uzročniku te o stadiju bolesti.

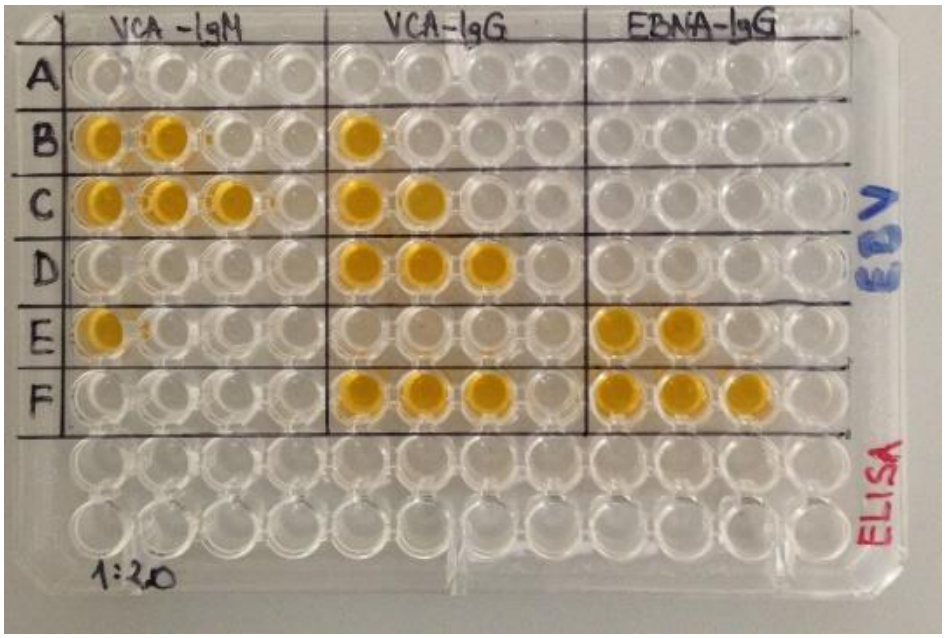
ELISA metoda

ELISA (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) je najčešća metoda u serologiji. Temelji se na vezanju antigena i antitijela koji zajedno stvaraju imunosnu reakciju. Na taj kompleks se veže enzim koji potom supstrat pretvara u signal, dovodi do promjene boje te se mjeri spektrofotometrijski. Ovaj test se temelji na imobilizaciji jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. Time je omogućeno ispiranje nevezanih komponenata iz reakcijske smjese. Vezane komponente koje su stvorile reakciju ostaju pričvršćene prilikom ispiranja. Mjerenje se provodi pomoću detektor protutijela koje je obilježeno enzimom. Detektor protutijelo se veže za već vezani kompleks antigen – antitijelo te tvori ″sendvič″. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama inteziteta obojenja. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna koncentraciji analita.



Slika 17. ELISA(sinobiological.com)

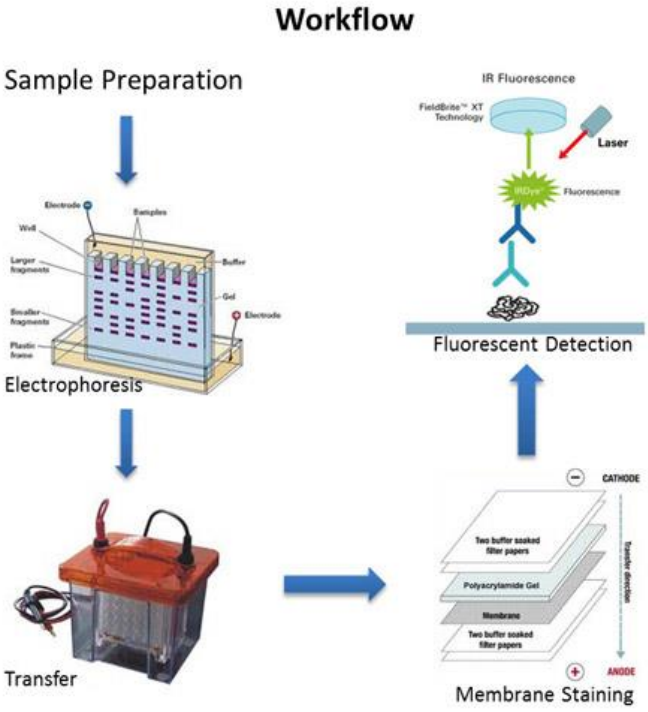
Osjetljivost ELISA testa je iznimno visoka, no može varirati ovisno o bolesnikovoj dobi, serotipu mikroorganizma ili kliničkom stadiju bolesti. Zbog visoke osjetljivosti ELISA se obično rabi za testove probira (eng. *Screening test*). Rezultati ELISA postupka izražavaju se kvalitativno (pozitivno, negativno) ili kvantitativno (titar, laboratorijske jedinice).



Slika 18. ELISA test(

Western blot metoda

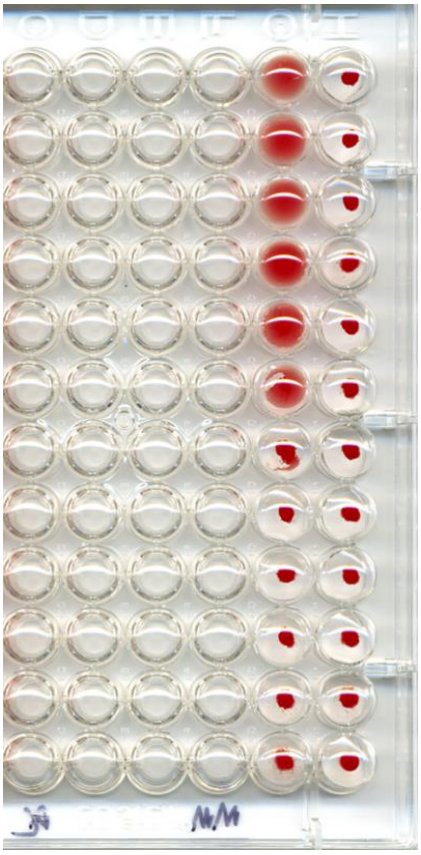
Western blot ili metoda određivanja imobiliziranog antigena na čvrstom nosaču otkriva protuvirusna ili druga antitijela u serumu ili nekoj drugoj tjelesnoj tekućini prema njihovoj reakciji na ciljne antigene koji su imobilizirani na membrani. Pročišćene virusne antigene elektroforezom se razdvoji prema njihovoj veličini na poliakrilamidnom gelu. Tako odvojeni slojevi antigena elektroforezom se prenesu s gela na nitroceluloznu traku. Kad se na takvu traku doda testirani serum, protutijela iz seruma pacijenta, ako postoje vezat će se za pripadni antigenski sloj. Vezana protutijela, nakon dodavanja konjugata otkrivaju se enzimskom reakcijom. Western blot se obično rabi za potvrđivanje pozitivnog rezultata dobivenog testom poput EIA ili ELISA zbog izrazito visoke specifičnosti koju ima.



Slika 19. Western blot(sinobiological.com)

Reakcija vezanja komplementa

Reakcija vezanja komplementa (RVK) je tehnika kojom se poznatim antigenima utvrđuje postojanje specifičnih protutijela u ispitivanom serumu. Prije izvođenja samog testa parni serumi (akutni i rekovalescentni) zagrijavaju se na 56 ºC 30 minuta da se inaktivira komplement. Zatim se u nizovima epruveta rade dvostruka razrijeđenja ispitivanog seruma u fiziološkoj otopini. Nakon inkubacije na 37 ºC90 minuta,za vrijeme koje se vežu antigen i antitijelo iz seruma (ako postoji), dodaju se ovčji senzibilizirani eritrociti koji su indikator reakcije. Ako do hemolize ne dođe tada je to znak pozitivne reakcije tj. znak da se u serumu nalaze specifična protutijela koja se vežu za antigen te titrom određujemo količinu tih protutijela. Ako do hemolize dođetada je to znak negativne reakcije tj. znak da se u serumu ne nalaze specifična protutijela.



Slika 20. Reakcija vezanja komplementa (RVK)(sinobiological.com)

3.2.Dijagnostika Epstein-Barr virusa

Prvi nespecifični pokazatelj moguće infekcije EBV-om su **reaktivni limfociti** koji također mogu biti prisutni i u infekciji CMV-om, rubeolom, zaušnjacima itd.

Heterofilna protutijela prisutna su u oko 85 % adolescenata i odraslih s infektivnom mononukleozom, ali često izostaju u mlađe djece s akutnom infekcijom. Ova protutijela nastaju nespecifičnom, virusnom stimulacijom limfocita B. Ta antitijela mogu aglutinirati ovčje (Paul-Bunnell-ov antigen), konjske i goveđe eritrocite. Za detekciju heterofilnih protutijela koristi se test aglutinacije (klasična reakcija aglutinacije po Paul-Bunnell-u ili komercijalni spot-test). Mogu se otkriti od kraja prvoga tjedna bolesti tijekom nekoliko mjeseci. U odraslih bolesnika, za razliku od djece, pouzdan su pokazatelj akutne infektivne mononukleoze zbog visoke osjetljivosti. Međutim, takva protutijela mogu biti prisutna i u serumu zdravih osoba, kao i u osoba oboljelih od limfoma.

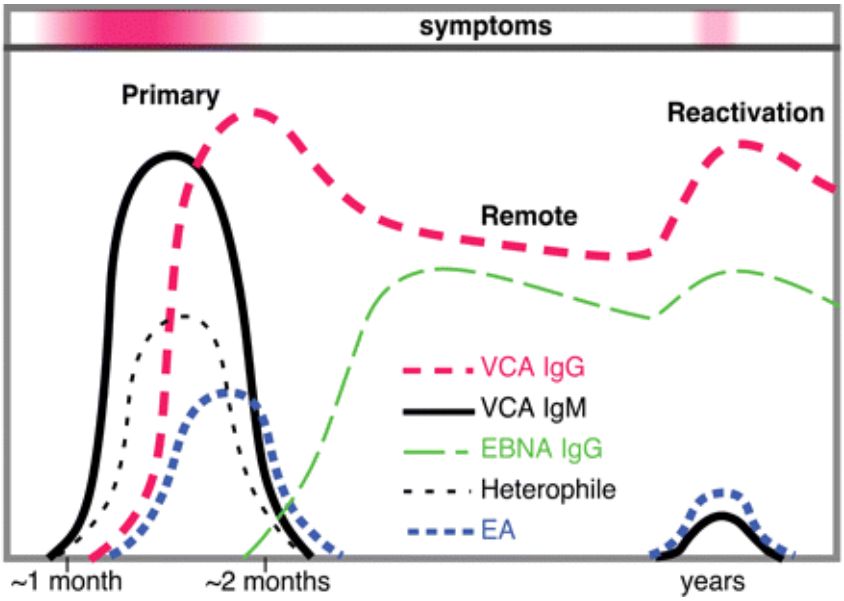
Stoga jepotrebno napraviti **specifičan test na EBV**. Najosjetljivija serološka metoda za otkrivanje infekcije jest neizravna imunoflorescencija (IFA – *Indirect immunoflorescent assay*). Stanice koje sadrže EBV će fluorescirati nakon dodira sa fluorescentnim antitijelima. Također se koriste ELISA, ELFA i imunoblot.

Titar IgM protutijela na virusni kapsidni antigen (VCA) je najosjetljiviji i specifičan test. Specifična EBV protutijela protiv različitih virusnih antigena upućuju na različite infekcije EBV-om:

1. Akutna (primarna) infekcija – povišena razina protutijela na VCA i rane antigene (EA), IgM i IgG protutijela protiv VCA, i odsutnost protutijela protiv EBNA,

2. Prošla infekcija – IgGprotutijela protiv VCA i protutijela protiv EBNA

3. Reaktivacija – IgM i IgG protutijela na VCA i protutijela protiv EBNA i EA



Slika 21. Serološki profil EBV infekcije

U imunokompetentnih osoba IgM VCA-protutijela ostaju prisutna u serumu 4-8 tjedana. Protutijela protiv EA prisutna su nekoliko mjeseci, dok su IgG-protutijela protiv VCA i protutijela protiv EBNA prisutna godinama, čak i doživotno.Neke osobe ne stvaraju protutijela protiv EBNA.

Kvantitativno određivanje titra virusa pomoću PCR-a može biti od koristi u procjenjivanju rizika od nastupajuće limfoproliferativne bolesti u transplantiranih osoba s EBV infekcijom.

3.3. Dijagnostika Citomegalovirusa (CMV)

Rutinsko otkrivanje infekcije CMV-om u današnje vrijeme je lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase chain reaction*; PCR). Ova metoda zamijenila je izolaciju virusa za koju je potrebno 2-3 tjedna da se na staničnoj kulturi pojave promjene na stanicama specifične za CMV, prvenstveno velike intranuklearne inkluzije. PCR je brza metoda koja otkriva virus dok je u fazi umnožavanja, a ne u fazi latencije. Najčešće su uzorci za ispitivanje krv i mokraća. Također PCR može pružiti informacije o količini virusa što je značajno za predviđanje razvoja bolesti.

Serološki rezultati mogu se uspješno tumačiti, ali serologija nije pouzdana u imunokompromitiranih bolesnika.

Anti-CMV IgM protutijela pojavljuju se 3-4 dana nakon infekcije, padaju nakon nekoliko tjedana i dalje sporo kroz 4- 6 mjeseci, mogu biti prisutni i do 8 mjeseci, a u transplantiranih do 2 godine.

Anti-CMV IgG pojavljuju se 1 tjedan nakon pojave IgM.

Kao i kod EBV-a, IgM-protutijela ukazuju na aktualnu infekciju, a IgG-protutijela na prošlu infekciju i na mogućnost reaktivacije. Pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih protiv virusnih antigena testom antigenemije se otkriva CMV u zaraženim leukocitima.

4. CILJ RADA

Rad je izrađen u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije (NZJZSDŽ) u Laboratoriju za serološku dijagnostiku.

Najosjetljivija populacija za infekciju CMV-om su novorođenčad i djeca,za infekciju EBV-om starija djeca i mladi ljudi do 24.godine. Infekcija ovim virusima najčešće je asimptomatska, a prijenos virusa vrlo jednostavan.Pravodobna dijagnoza je od osobite važnosti u svrhu pravodobnog i pravovaljanog liječenja.

Metode dijagnostike trebaju biti što osjetljivije i specifičnije, a pacijentima što jednostavnije i neinvazivne.

Cilj radabio je:

1. Objasniti postupak uzorkovanja krvi
2. Opisati metode dijagnostike EBV-a i CMV-a
3. Dijagnosticirati specifična protutijela na EBV i CMV
4. Interpretirati rezultate

5. METODE

5.1. Uzorkovanje

Upute za uzimanje uzorka za otkrivanje EBV-a i CMV-a metodom ELFA

Za uspješnu dijagnostiku potrebno se pridržavati se uputa za uzorkovanje.

METODA: Dijagnostika ELFA (eng. *Enzyme linked fluorescent assay*) metodom

UZORAK: Serum dobiven iz pune krvi uzete venepunkcijom iz antekubitalne vene

VENEPUNKCIJA (UZIMANJE UZORKA PUNE KRVI)

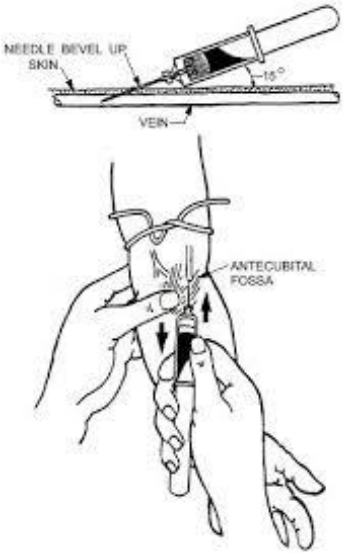
1. Pripremiti pribor za vađenje krvi: epruveta bez antikoagulansa (biokemijska epruveta), igla, podveza, pamučna vata, dezinficijens (70% alkohol, eter, benzin), rukavice, epruveta za odlaganje igala i infektivnog materijala
2. Označavanje epruveta: ime i prezime, datum rođenja ili barkod (ime i prezime, datum rođenja, laboratorijski broj)
3. Odrediti položaj za vađenje krvi: sjedeći ili ležeći položaj
4. Staviti rukavice: prije svakog vađenja te za svakog bolesnika novi par
5. Staviti podvezu: ne držati dulje od 1 minute, staviti je 7-10 cm iznad mjesta uboda
6. Odabir mjesta uboda: antekubitalna vena, vena sa nadlaktice
7. Dezinfekcija mjesta uboda: prebrisavanje sterilnom pamučnom vatom namočenom 70% alkoholom, brisanje cirkularnim pokretima iz centra prema periferiji
8. Uzorkovanje: Umetanje igle u držač, pozicionirati i pridržavati ruku pacijenta distalno od mjesta uboda, ući u venu pod kutem od 30° ili manjim, prisloniti spremnik te kada krv poteče otpustiti podvezu. Nakon što je spremnik napunjen izvući spremnik prije izvlačenja igle, staviti pamučnu vatu preko mjesta uboda te odložiti iglu u spremnik za infektivni otpad
9. Miješanje epruvete



Slika 22. Epruvete za uzorkovanje



Slika 23. Vrste igala za uzorkovanje



Slika 24. Mjesto uboda



Slika 25. Postupak venepunkcije

DOBIVANJE SERUMA IZ UZORKA PUNE KRVI

1. Uzorak za serološku dijagnostiku EBV-a i CMV-a jest serum odvojen iz uzorka bolesnikove venske krvi. Uzima se obično 8-10 mL krvi u odraslih, odnosno 3-4 mL u djece
2. Epruvetu s uzorkom krvi treba ostaviti najmanje 20-30 minuta na sobnoj temperaturi, sve dok se ne stvori ugrušak
3. Ugrušak se potom odstrani, a preostali dio se centrifugira na 10 minuta i 2000 rpm radi izdvajanja seruma
4. Nakon što centrifuga završi odpipetira se serum u novu epruvetu, a talog s krvnim stanicama se odlaže u infektivni otpad koji se posebno zbrinjava

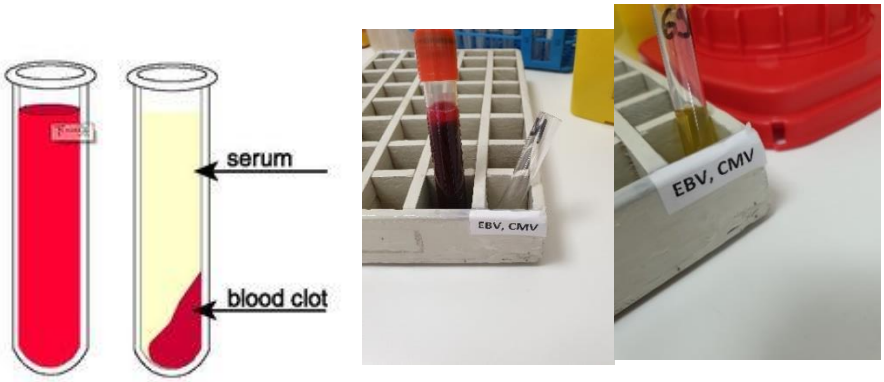


Slika 26. Centrifuga



Slika 27. Vremenski period i broj okretaja

Serum se pohranjuje na temperaturi od 2-8ºC 5 dana, a za dugotrajnu pohranu potrebno je uzorak čuvati na temperaturi od -20ºC i nižoj. Preporučuje se ne koristiti hemolizirane, lipemične ili ikterične uzorke. U tom slučaju treba uzeti novi uzorak zbog interferencije vezane uz serum. Opetovana zamrzavanja i odmrzavanja treba izbjegavati. Dozvoljena su tri ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Ispitivanje smrznutih uzoraka moguće je i do 6 mjeseci od uzimanja uzorka s jednakovrijednim rezultatima.



Slika 28. Prikaz seruma i pune krvi

5.2. Dijagnostika ELFA metodom

Sustav Vidas 30 služi za kvalitativno otkrivanje specifičnih protutijela na EBV i CMV te na toksoplazmu metodom ELFA.

Pribor i aparati

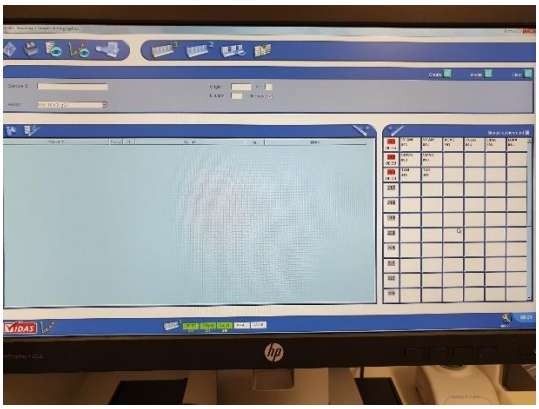
BioMérieux Vidas 30 sastoji se od:

- Računalo (Vidas 30 software)

- BioMérieux Vidas 30 imunokemijski analizator



Slika 29. Vidas 30 imunokemijski analizator



Slika 30. Software Vidas 30

Pribor se sastoji od komercijalno proizvedenih materijala tvrtke BioMérieux potrebnih za otkrivanje specifičnih protutijela, a sastoji se od:

1. Kadice, stripovi koji sadrže antigene na svojoj stijenci potrebne za vezanje protutijela iz seruma pacijenta, ako postoje.

Svaka kadica se sastoji od 10 jažica od kojih prva služi za ubacivanje uzorka dok zadnja služi za fluorimetrijsko mjerenje. Ostale jažice sadrže različite reagense potrebne za odvijanje testa.



Slika 31. Kadica

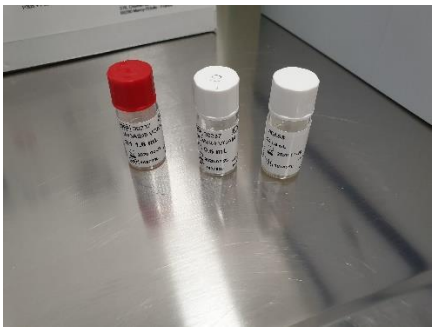


Slika 32. Kadice i pipete

2. Pipeta
3. Standard
4. Pozitivna kontrola
5. Negativna kontrola

Reagensi se čuvaju u hladnjaku na 2 – 8ºC i ne smiju se zamrzavati. Pribor ima rok valjanosti od mjesec dana kada se mijenja cjelokupni pribor za pojedino protutijelo.

Kalibracija standardom sadržanim u kitu provodi se prilikom prve uporabe novog serijskog broja reagensa i nakon unosa baznih kalibracijskih podataka. Kalibracija se ponavlja svakih mjesec dana. Na ovaj način se osigurava specifična kalibracija instrumenta i kompenziraju minimalne varijacije testnog signala tijekom roka trajanja kita. Kalibracija se radi s dva ili tri standarda, po uputi za rad te se kontrolira s pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima. Na ovaj način se kroz kontinuiranu kontrolu kvalitete dobije potvrda o ispravnosti rada aparata.



Slika 33. Standard,pozitivna i negativna kontrola



Slika 34. Kitovi za dijagnostiku EBV-a



Slika 35. Kitovi za dijagnostiku CMV-a

Vidas 30 imunokemijski analizator

Uređaj Vidas 30 s kojim se radi pretraga na infektivnu mononukleozu radi na principu ELFA (*Enzyme-linked fluorescent assay*). Uređaj se koristi na sljedeći način:

1. Svakodnevno prije puštanja aparata u rad u njega se stavljaju pozitivna i negativna kontrola da bi utvrdili jesu li kontrole u definiranim intervalima zadanih od strane proizvođača, a samim time je li aparat ispravan za početak rada
2. Punjenje aparata uzorcima, reagensima i potrošnim materijalom
3. Odpipetira se po 100 µL seruma za svaku kadicu. Za jednu traženu pretragu bude pet kadica: za određivanje IgM, IgG protutijela i EBNA za EBV te IgM i IgG protutijela za CMV
4. Postupak traje oko 30 minuta te na kraju dobijemo rezultate pretrage, odnosno prisustvo ili odsustvo specifičnih protutijela na EBV i CMV



Slika 36. Postupak stavljanja kadica sa serumima u analizator

Princip dijagnostike ELFA metodom

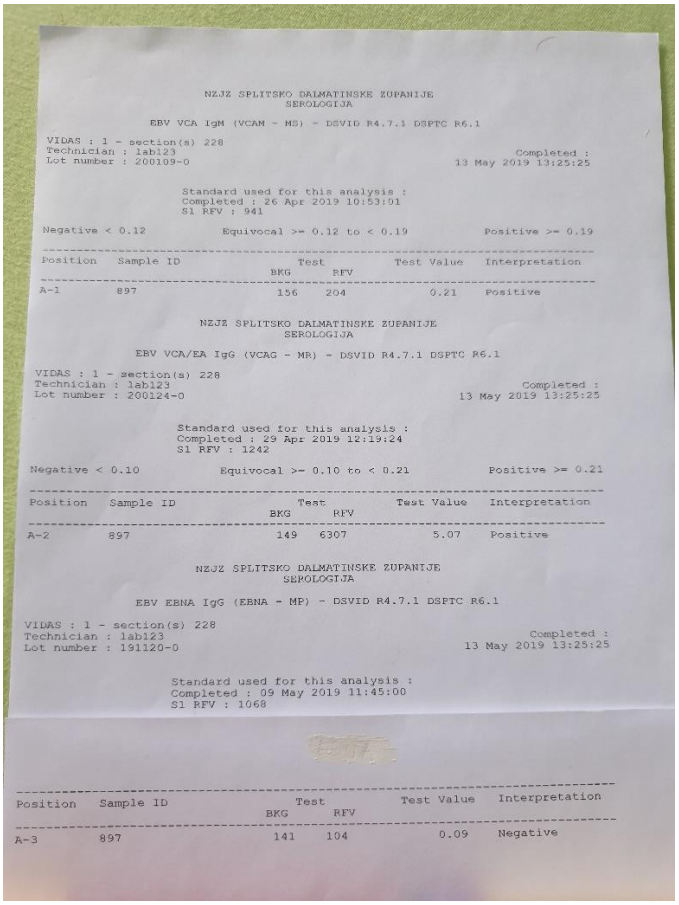
Princip testa je kombinacija dvostupanjskog sendvič enzimskog imunotesta sa krajnjim očitanjem fluorescencije. Ovo je automatizirana metoda čije je vrijeme trajanja oko 30 minuta. ELFA je test u kojem se koristi označeno protutijelo i konjugirajuće protutijelo koje stupaju u imunoreakciju s analitom u uzorku.U jažicama se nalaze protutijela protiv označenih protutijela te se čitavi kompleks (označeno protutijelo-konjugirajuće protutijelo-analit) veže.

Nakon inkubacije, jažice se isperu kako bi se uklonio nevezani sadržaj. Zatim se dodaje otopina sa supstratom. Ponovno se inkubira, ukoliko je uzorak pozitivan (sadrži tražena protutijela) supstrat se pri tome katalizira te nastaje fluorescentni produkt čiji se signal mjeri pomoću fluorescentnog čitača mikroploča na valnoj duljini od 450 nm. Intezitet fluorescencijeproporcionalan je koncentraciji protutijela prisutnih u uzorku. Izrazito je osjetljiva metoda te se koristi u real-time analizama.Osjetljivost i specifičnost testa su vrlo visoke; preko 95%. I zato se smatra vrlo pouzdanim testom za otkrivanje EBV-a i CMV-a.

6. REZULTATI

Kod Vidas uređaja rezultati se dobivaju kvalitativno. Za svako pojedinačno protutijelo EBV-a i CMV-a postoji referentni interval koji kvantitativno određuje je li ispitivani uzorak seruma negativan ili pozitivan na ispitivane viruse.

Ispitivani uzorak je pozitivan na EBV specifična IgM i IgG protutijela, a negativan je na EBNA protutijela. Sukladno ovom rezultatu, zaključujemo da je pacijent u akutnoj ili subakutnoj infekciji EBV-om.



NZJZ SPLITSKO DALMATINSKE ZUPANIJE
SEROLOGIJA

EBV VCA IgM (VCAM - MS) - DSVID R4.7.1 DSFTC R6.1

VIDAS : 1 - section(s) 228
Technician : lab123
Lot number : 200109-0
Completed :
13 May 2019 13:25:25

Standard used for this analysis :
Completed : 26 Apr 2019 10:53:01
S1 RFV : 941

Negative < 0.12 Equivocal >= 0.12 to < 0.19 Positive >= 0.19

Position	Sample ID	Test BKG	Test RFV	Test Value	Interpretation
A-1	897	156	204	0.21	Positive

NZJZ SPLITSKO DALMATINSKE ZUPANIJE
SEROLOGIJA

EBV VCA/EA IgG (VCAG - MR) - DSVID R4.7.1 DSFTC R6.1

VIDAS : 1 - section(s) 228
Technician : lab123
Lot number : 200124-0
Completed :
13 May 2019 13:25:25

Standard used for this analysis :
Completed : 29 Apr 2019 12:19:24
S1 RFV : 1242

Negative < 0.10 Equivocal >= 0.10 to < 0.21 Positive >= 0.21

Position	Sample ID	Test BKG	Test RFV	Test Value	Interpretation
A-2	897	149	6307	5.07	Positive

NZJZ SPLITSKO DALMATINSKE ZUPANIJE
SEROLOGIJA

EBV EBNA IgG (EBNA - MP) - DSVID R4.7.1 DSFTC R6.1

VIDAS : 1 - section(s) 228
Technician : lab123
Lot number : 191120-0
Completed :
13 May 2019 13:25:25

Standard used for this analysis :
Completed : 09 May 2019 11:45:00
S1 RFV : 1068

Position	Sample ID	Test BKG	Test RFV	Test Value	Interpretation
A-3	897	141	104	0.09	Negative

Slika 37. Rezultat pretrage na EBV

6.1. Interpretacija nalaza

Tablica 1. Postavljanje dijagnoze EBV infekcije po enzimima imunotestnog protutijela

Faza infekcije	*Vrijeme nakon početka bolesti*	*VCA IgM*	*VCA IgG*	*EBNA-1 IgG*
Bez prisustva EBV-a	—	Negativno	Negativno	Negativno
Akutna primarna infekcija	0–3 tjedna	Pozitivno	Negativno ili pozitivno	Negativno
Subakutna infekcija	4 tjedna–3 mjeseca	Pozitivno	Pozitivno	Negativno
Kovalescentna infekcija	4–6 mjeseci	Negativno ili pozitivno	Pozitivno	Negativno ili pozitivno
Prošla infekcija	> 6 mjeseci	Negativno	Pozitivno	Pozitivno

7. ZAKLJUČAK

Uzročnici infektivne mononukleoze su Epstein-Barr virus i Citomegalovirus koji se nalaze u krvi i tjelesnim tekućinama inficirane osobe.Najčešće obolijevaju djeca i adolescenti. Put prijenosa tih virusa može biti kapljični, spolnim kontaktom, transfuzijom krvi ili presadbom solidnih organa s inficiranog davatelja u tijelo primatelja.

Infektivna mononukleoza uglavnom nije klinički značajna zbog toga što kod djece često prođe neopaženo, tj. asimptomatski ili pojavom nespecifičnih simptoma. Rijetko se javlja teža komplikacija u obliku rupture slezene i težih oštećenja središnjeg živčanog sustava i smrtnog ishoda, te zbog svega toga ona nema osobitu značajnost u ukupnom morbiditetu i mortalitetu od zaraznih bolesti.

Serološke pretrage na mononukleozu su česte pretrage u mikrobiološkim laboratorijima jer se i EBV i CMV lagano šire u populaciji. U ljudima se mogu nalaziti i u latentnom stanju koji u bilo kojem trenutku pada imuniteta mogu doći do izražaja i do pojave bolesti.

Liječenje infektivne mononukleoze je simptomatsko; virusna je infekcija za koju još uvijek ne postoji adekvatno cjepivo. Za sprječavanje i prevenciju širenja mononukleoze preporučuje se izbjegavati kontakt sa slinom osoba koje su nedavno preboljele mononukleozu i održavati visok stupanj higijene, osobito dječjih igračaka i predmeta koje djeca stavljaju u usta.

8. SAŽETAK

Infektivna mononukleoza je virusna bolest limfnog sustava koja klinički nije toliko značajna jer rijetko izaziva tešku bolest s po život ozbiljnim komplikacijama i posljedicama. Infektivna mononukleoza uglavnom ima blagi tijek bolesti; bolest je karakterizirana umorom, vrućicom, faringitisom, nelagodom, hepatosplenomegalijom, limfoadenopatijom i probavnim neugodnostima. Bolest zahvaća najčešće djecu i adolescente slabijeg imovinsko-socijalnog statusa i djecu iz zemalja u razvoju. Prema nalazima specifičnih protutijela u serumu, 95% djece siromašnijih područja preboli ovu infekciju u predškolskoj dobi.

Virusi koji uzrokuju infektivnu mononukleozu su Epstein-Barr virus i Citomegalovirus. Oni pripadaju porodici *Herpesviridae.* Najvažnije svojstvo ovih virusa je da uzrokuju doživotne infekcije s povremenim razdobljima reaktivacije. Bolesti se mogu pojaviti u rasponu od klinički neopaženih pa sve do zloćudnih tumora kao što su Burkittov limfom, Hodgkinov i non-Hodgkinov limfom, nazofaringealni karcinom te bolesti prilikom presađivanja solidnih organa ili koštane srži.

Infektivna mononukleoza se dijagnosticira najčešće metodama neizravne dijagnostike (ELISA i ELFA metode). Pretrage se odvijaju na principu određivanjaprotutijela u serumu bolesnika. U primarnom imunosnom odgovoru javljaju se IgM protutijela koja ukazuju na akutnu infekciju imogu sedijagnosticirati između prvog i drugog tjedna od infekcije. Nakon drugog tjedna javljaju se IgG protutijela koja ukazuju na preboljenu infekciju i mogu se dijagnosticirati bilo kad, jer oni ostaju doživotno u krvi. U sekundarnom imunosnom odgovoru IgG protutijela imaju brži i jači intezitet djelovanja nego u primarnom imunosnom odgovoru zbog toga jer se izlučuju iz već postojećih memorijskih stanica koje su nastale pri prvom kontaktu sa stranim antigenom.

9. ABSTRACT

Infectious mononucleosisis a viral disease of the lymph system, clinically not so significant because its clinical symptoms are rarely severe with life-threatening serious complications and consequences. Infectious mononucleosis is mild disease; characterized by fatigue, fever, pharyngitis, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy and digestive discomfort. The disease affects commonly children and adolescents with low social status and children from developing countries. According to the findings of specific serum antibodies, 95% of children in developing countries get over this infection at pre-school age.

Viruses that cause infectious mononucleosis are the Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus. They belong to the Herpesviridae family. The most important characteristic of the viruses is that they cause lifelong infections with occasional reactivation periods. Diseases can range from clinically unobserved to malignant tumors such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, nasopharynges carcinoma, and disease in solid organ or bone marrow transplantation.

The most common methods for the diagnosis of infectious mononucleosis are indirect methods(ELISA and ELFA methods). Testing is based on the antibody determination in the patient's serum. In the primary immune response, IgM antibodies occur which indicate an acute infection and can be diagnosed between the first and second week of infection. After the second week, IgG antibodies occur and indicate a past infection. IgG antibodies can be diagnosed any time because they remain in the blood for life. In the secondary immune response, IgG antibodies have a faster and stronger intensity of action than in the primary immune response because they are excreted from the memory cells that have already occurred at first contact with the foreign antigen.

10. LITERATURA

1. Presečki V., Presečki-Stanko A., Lukić-Grlić A. *Virusi – Opće osobine, građa, umnožavanje, genetika* U: Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija, Zagreb, Medicinska naklada; 2019., str. 353-75

2. Presečki V., Mlinarić-Galinović G., Punda-Polić V., Lukić A. Virologija, Zagreb, Medicinska naklada; 2002., str. 3-26; 91-118; 152-62

3. Beader N. *Herpesvirusi* U: Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija, Zagreb, Medicinska naklada; 2019., str. 410; 416-22

4. Brooks G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A.*Virologija* U: Tonkić M., Dobec M., Abram M. (stručni urednici hrvatskog izdanja),Medicinska mikrobiologija, Split, Placebo; 2015., str. 467-71; 480-87

5. Vince A., Dušek T. *Virusne infekcije u hematoloških bolesnika* U: Labar B. i sur. Hematologija, Zagreb, Školska knjiga; 2017., str 616-8; 620-2

6. Taradi M. *Građa protutijela i antigenskih receptora limfocita* B U: Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. Imunologija, Zagreb, Medicinska naklada; 2010., str. 58-78

7. Andreis I., Lukinović-Škudar V., Grčević D, Marušić M. *Antigeni* U: Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. Imunologija, Zagreb, Medicinska naklada; 2010., str. 146-55

8. Southwick F., Ivić I. Infektivne bolesti-kratki klinički tečaj, Split, Placebo; 2017., str. 369-72; 381-2

9. Kačić M., Mardešić D. *Virusne bolesti* U: Mardešić D. i sur. Pedijatrija, Zagreb, Školska knjiga; 2003., str. 520-2

10. Dodig S. Imunokemija, Zagreb, Medicinska naklada; 2015.

11. Volner Z., Batinić D. i sur. Opća medicinska mikrobiologija i imunologija, Zagreb, Školska knjiga; 2005., str. 290-7

12. Sertić J. i sur. Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga, Zagreb, Medicinska naklada; 2009., str. 267

13. Medicinska enciklopedija svezak 3, Zagreb, Jugoslavenski leksikografski zavod; 1968., str. 430-2

14. Puntarić D., Ropac D. i sur. Epidemiologija zaraznih bolesti, Zagreb, Medicinska naklada; 2010., str. 19-20

15. Brudnjak Z. *Virusologija* U: Karakašević B. Mikrobiologija i parazitologija, Beograd-Zagreb, Medicinska knjiga; 1986., str. 1193-211; 1274-8

16 . Volk W. A., Benjamin D. C., Kadner R. J., Thomas Parsons J. Essentials of medical microbiology, Philadelphia, J. B. Lippincott Company; 1991., str. 571-602; 610-15

17. Nester E. W., Anderson D. G., Evans Roberts Jr. C., Pearsall N. N., Nester M. T. Microbiology, a human perspective, New York, The McGraw-Hill Companies; 2004., str. 726-9

18. Cowan M. K., Talaro K. P. Microbiology, A Systems Approach, New York, The McGraw-Hill Companies; 2009., str.621-2

19. Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. Principles and Practices of Infectious Diseases Volume 2, str. 1599-608

20. Đaković-Rode O., Židovec-Lepej S., Grgić I., Vince A. *Imunološki odgovor u infekciji Epstein-Barrovim virusom*; Croatian Journal of Infection 2009 Sep; 25(3):111-5

21. Dunmire S. K., Hogquist K. A., Balfour Jr. H. H. *Infectious mononucleosis* Curr Top Microbiol Immunol; Feb 2015.; 390: 211-40

22. Ebell M. H. *Epstein-Barr virus Infectious Mononucleosis* Am Fam Physician; Oct 2004.; 70(7): 1279-87

11. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Nino Ninić

Datum rođenja:02.10.1997.

Adresa stanovanja: Prilaz tvornici 8, 22000 Šibenik

Mobitel:095/888-8390

e-mail: ninonini97@gmail.com

OBRAZOVANJE

2004.-2012. Osnovna škola Jurja Dalmatinca, Šibenik

2012.-2016. Medicinska škola Šibenik, Šibenik, smjer farmaceutski tehničar

2016.-2019. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Split, Medicinsko-laboratorijska dijagnostika