

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Virus Epstein a Barrové ve vztahu k infekcím
centrální nervové soustavy**

Bakalářská práce

Adéla Motejzík

školitel: doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

České Budějovice 2014

Motejízková, A., 2014: Virus Epstein a Barrové ve vztahu k infekcím centrální nervové soustavy. [Epstein-Barr Virus in relation to infections of the central nervous system. Bc Thesis, in Czech] – p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

This thesis is about Epstein-Barr Virus and his correlation with infection of the central nervous system. There is described pathogenesis, clinical presentation, epidemiology and treatment neuroinfections which are caused by Epstein-Barr Virus. I deal with PCR and other methods of detection.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 25. 4. 2014

.....
Adéla Motejízková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za cenné připomínky a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala přátelům a rodině, která mě po celou dobu studia podporuje.

Obsah

Obsah	4
1. Úvod	1
2. Historie	2
3. Patogeneze EBV	3
3.1 Obecné informace	3
3.2 Latentní fáze	3
3.3 Lytická fáze	3
4. Klinické projevy EBV infekce	5
4.1 Infekční mononukleóza	5
4.2 Malignity asociované s EBV	6
4.2.1 Burkittův lymfom	6
4.2.2 Nasofaryngeální lymfom	7
4.2.3 Hodgkinův lymfom	7
4.2.4 Lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozóm.....	8
5. Epidemiologie EBV.....	9
6. Léčba neuroinfekcí způsobených EBV	10
6.1 Neuroinfekce způsobené EBV	11
6.1.1 Komplikace CNS při IM.....	11
6.1.2 Meningitida.....	11
6.1.3 Encefalitida.....	11
6.1.4 Lymfomy CNS u AIDS	12
6.1.5 Posttransplantační lymfoproliferativní onemocnění.....	13
6.1.6 Guillain-Barré syndrom.....	15
6.1.7 Myeloradikulitida a encefalomyeloradikulitida.....	15
6.2 Chronický únavový syndrom	16
6.3 Vyhledky pro vakcíny	16

7. Vztah EBV k rozvoji roztroušené sklerózy	18
7.1 Roztroušená skleróza	18
7.2 Vztah roztroušené sklerózy a EBV	18
7.2.1 Důkazy o vztahu EBV a roztroušené sklerózy	19
8. Zhodnocení PCR a jiných detekčních metod pro diagnostiku neuroinfekcí	21
8.1 Diagnostika EBV	21
8.2 Polymerázová řetězová reakce	22
8.2.1 Základní princip PCR	22
8.2.2 Použití PCR při detekci EBV	23
9. Úskalí laboratorní diagnostiky neuroinfekcí způsobených EBV	24
10. Diskuze	25
11. Závěr	27
12. Seznam použité literatury	29
12.1 Seznam zdrojů ilustrací	31

Cíl práce

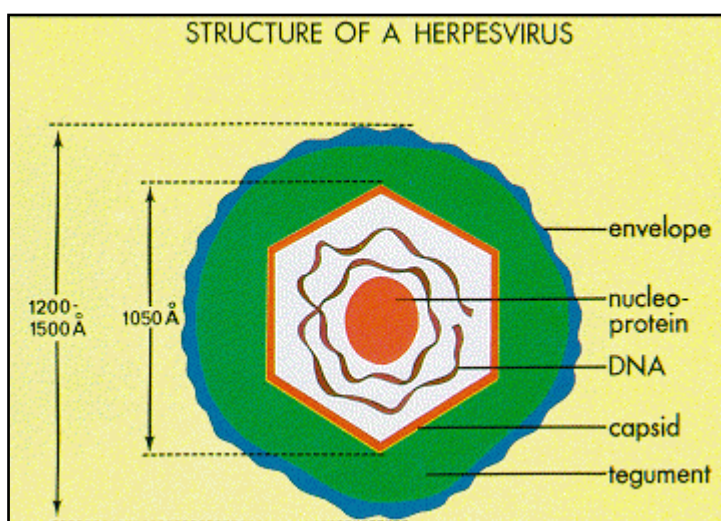
Cílem mé práce je shrnout literární data zaměřená na patogenezi, klinickou prezentaci, epidemiologii a léčbu neuroinfekcí způsobených virem Epstein a Barrové. Představím vztah viru Epstein a Barrové k rozvoji roztroušené sklerózy. Dále budu hodnotit PCR a jiné detekční metody, které jsou určeny pro diagnostiku neuroinfekcí způsobených virem Epstein a Barrové a představím úskalí laboratorní diagnostiky.

1. Úvod

Herpetické viry neboli herpesviry jsou významnou skupinou patogenních virusů savců, ptáků a plazů. U člověka mohou tyto viry způsobovat triviální kožní a slizniční léze, život ohrožující infekce, ale také se podílejí na vzniku určitých maligních nádorů. Herpesviry patří do velké čeledi *Herpesviridae*, která se dělí do tří podčeledí *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gammapherpesvirinae*. Právě do podčeledi *Gammapherpesvirinae* patří virus Epstein a Barrové (Rajčáni a Čiampor 2006).

Virus Epstein a Barrové (EBV) je známý též jako lidský herpesvirus 4 (HHV – 4) nebo EB virus. Tento virus je přenášen orálně a horizontálně tedy mezi jedinci, kteří nemusejí být v příbuzenském vztahu. K prvnímu setkání s infekcí dochází většinou v dětství bez projevu onemocnění, virus má schopnost přetrvávat v latentní podobě po zbytek života jedince a v určitý okamžik být reaktivován. Nejčastějším projevem infekce EBV je infekční mononukleóza (IM), ale virus bývá také spojován s několika typy rakoviny a s neuroinfekcemi (Volpi, a další 2013).

Hrubě kulatý virion je 150 až 200 nm v průměru a skládá se z ikosaedrálního nukleokapsidu, který obsahuje lineární dvouřetězcovou DNA (Volpi a Pica, 2013). Nukleokapsid má 162 kapsomer a mezi kapsidem a obalem se nachází amorfní vrstva proteinů, která se nazývá tegument. Celý virion je obalen lipoproteinovým obalem s glykoproteinovými výběžky (Rajčáni a Čiampor 2006). Celý virion můžeme vidět na obrázku 1.



Obr. 1: Struktura viru Epstein a Barrové. ^[1]

2. Historie

EBV byl objeven díky klinickému a epidemiologickému pozorování neobvyklých typů rakoviny dětí v rovníkové Africe. V roce 1958 chirurg Denis Burkitt identifikoval neznámou formu rakoviny (dnes známou jako Burkittův lymfom), která postihovala čelisti mladých afrických dětí (Sugden, a další 1994). Zjistil, že výskyt lymfomu je ovlivňován teplotou a množstvím srážek a domníval se, že toto onemocnění je přenášeno komáry, toto tvrzení bylo později vyvráceno.

V roce 1964 Michael Anthony Epstein a Yvonne M. Barrová se svými kolegy izolovali nový herpesvirus z kultury nádorových buněk (odtud název pro EBV) (Epstein, a další 1964). Později bylo zjištěno, že tento nový virus má také souvislost s nasofaryngeálním karcinomem v jihovýchodní Asii a infekční mononukleózou. EBV kromě toho také způsobuje B-buněčné lymfomy u imunodeficientních pacientů (Epstein, a další 1964).

3. Patogeneze EBV

3.1 Obecné informace

V dětství probíhá infekce EBV obvykle bez příznaků. Virus šíří slinami a napadá zpočátku epitelové buňky *oropharynxu*. Později virus napadá B-lymfocyty. Za normálních okolností je proliferace B-lymfocytů, která je řízena EBV, zachycena cytotoxickými T-lymfocyty a NK buňkami. Ty jsou schopné zachytit velkou většinu nakažených buněk, ale malá část napadených B-lymfocytů přežívá (Sugden, a další 1994).

Podobně jako u jiných gammaherpesvirusů EBV infikuje buňky v těle jedince po celý život. U primární infekce, kde je klinickým projevem infekční mononukleóza, dochází k latentní (neproduktivní) infekci v B-lymfocytech. Po prodělání IM anebo po primární infekci, která měla skrytý průběh, DNA virusu zůstává v B-lymfocytech ve formě latence typu I. Patogeneze nádorů souvisí s latencí typu II/III, při které se exprimuje membránový antigen latence LMP1 a jaderné antigeny EBNA (Rajčáni a Čiampor 2006).

3.2 Latentní fáze

Nejprve dojde k navázání EBV na B-lymfocyty pomocí interakce EBV gp350/220 obalového glykoproteinu s molekulou CD21 na B-lymfocyty. Potom dojde k fúzi membrány, což umožní vstup virusu do cytoplazmy hostitelské buňky. Po proniknutí do buňky se virus rozloží a genom je transportován do jádra.

Schopnost EBV účinně indukovat transformaci růstu B-lymfocytů je vícestupňový proces. Nejdříve se klidové B-lymfocyty stanou aktivní a přejdou do buněčného cyklu. Poté se infikované buňky začnou množit způsobem závislejícím na vysoké hustotě buněk a na autokrinní produkci cytosinů, které podporují růst B-lymfocytů. Postupně se infikované buňky množí, vyvíjejí rychleji a nejsou už tolik závislé na autokrinních mechanismech růstu (Sugden, a další 1994).

3.3 Lytická fáze

Systém aktivace tohoto onemocnění není dosud přesně známý, na aktivaci by mohlo mít vliv snížení imunity, například po prodělání závažnějšího onemocnění. Nejúčinněji dochází k replikaci EBV v epiteliálních buňkách, ale také může dojít ke spontánní replikaci v B-lymfocytech, které jsou v latentní fázi (Sugden, a další 1994).

Po různých podnětech může tedy dojít k reaktivaci virusu, ta je obvykle asymptomatická, ale jedinec se stává krátkou dobu zdrojem infekce. U imunokompromitovaných pacientů pak může dojít k rozvoji několika maligních onemocnění (Smíšková 2012).

4. Klinické projevy EBV infekce

4.1 Infekční mononukleóza

Infekční mononukleóza (IM) je klinicky nejznámějším a nejtypičtější formou primární infekce EBV. Vzácně může být vyvolána cytomegalovirem (CMV). Onemocnění začíná nejprve pozvolna. Mezi první příznaky patří únava a nechutenství, později se přidává horečka, bolest v krku a otok lymfatických uzlin. Běžná bývá také hypertrofie tonzil, na kterých se objevují šedobílé povlaky, to můžeme vidět na následujícím obrázku.



Obr. 2: Hypertrofické tonzily s šedobílými povlaky. ^[2]

Tento stav vede k bolestivému polykání a někdy také ke ztíženému dýchání. V prvních dnech onemocnění bývá patrný také otok víček (Bassův příznak), u 25–60% pacientů se objevují drobné petechie na přechodu tvrdého a měkkého patra (Holzelovo znamení). U více než poloviny nemocných se objevuje splenomegalie, hepatomegalie je méně častá. Někdy se objeví i necharakteristický makulopapulozní exantém. K rozvoji těžkého svědivého makulopapulozního enantému dochází u většiny případů po podání aminopenicilinového antibiotika (Smíšková 2012).

K ústupu příznaků dochází zhruba po 2 týdnech, únava a malátnost mohou přetrvávat i déle. Jako léčba se doporučuje klidový režim a jaterní dieta. Život ohrožující komplikací může být ruptura zvětšené sleziny, encefalitida (tj. zánět mozku), myelitida (tj. zánět míchy), radikulitida (tj. zánět míšních kořenů), transverzální meningitida (tj. zánět mozkových blan) (Smíšková 2012).

4.2 Malignity asociované s EBV

U imunokompromitovaných pacientů EBV může transformovat růst lymfocytů a to vede k rozvoji maligních onemocnění. U imunokompetentních pacientů dochází k malignímu onemocnění výjimečně, záleží na vedlejších vlivech prostředí nebo genetických vlohách (Smíšková 2012).

4.2.1 Burkittův lymfom

Tento vysoce maligní nádor se vyskytuje především u afrických dětí, jejichž imunitní systém je chronicky aktivován malárií. Jedná se o nádor lymfatických uzlin, v krevním obraze můžeme vidět proliferující oválné buňky s tmavými jádry, které jsou podobné lymfoblastům. Nejčastěji se vyskytuje v krčních uzlinách, jedná se o nádor čelisti. Mezi hlavní příznaky patří zvětšení lymfatických uzlin a sleziny, dále poškození kostní dřeně a thymu, hepatitida a myokarditida (Rajčáni a Čiampor 2006). Na následujícím obrázku můžeme vidět Burkittův lymfom.

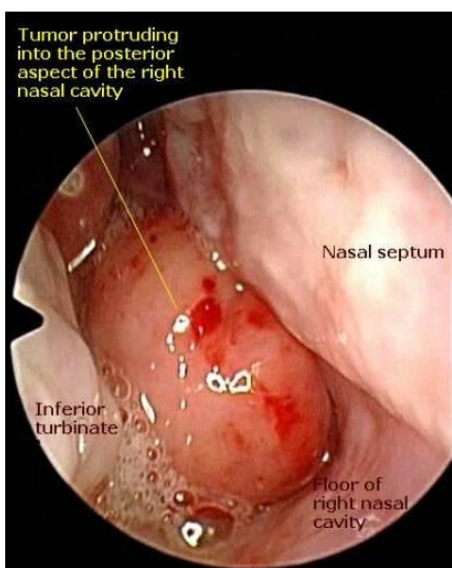


Obr. 3: Africké dítě s Burkittovým lymfomem. ^[3]

Nejčastějším výskytem je Afrika a Papua Nová Guinea, občas se mohou objevit případy i jinde po světě. Pokud je onemocnění neléčené, jedinec umírá, ale pokud je léčba chemickým terapeutikem zahájena včas, může vést k uzdravení. Tímto typem lymfomu mohou také onemocnět pacienti, kteří jsou v počátečním stadiu AIDS (Perkins a Friedberg 2008).

4.2.2 Nasofaryngeální lymfom

Tento typ nádoru je častý v jižní Číně a jihovýchodní Asii, v těchto oblastech se jedná o nejčastější druh zhoubného nádoru. Virus napadá hlavně epitelové buňky, v séru můžeme vidět zvýšenou hladinou IgA proti virovému kapsidovému antigenu (Smíšková, 2012). Obvykle se projevuje zvětšenými cervikálními lymfatickými uzlinami, kam nádor metastazuje. Nejčastěji postihuje věkovou skupinu 20-50 let a onemocnění se projevuje častěji u mužů než u žen. Tento nádor je poměrně těžko léčitelný a nemívá dobrou prognózu (Xie, a další 2013). Na obrázku číslo 4 můžeme vidět nasofaryngeální lymfom.



Obr. 4: Nasofaryngeální lymfom. ^[4]

Na obrázku vidíme lymfom, který vyčnívá do dorzální pravé nosní dutiny. Na levé straně se nachází skořepky a na pravé nosní přepážka.

4.2.3 Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom (HL) patří do skupiny lymfoproliferativních onemocnění. V nádorové populaci se vyskytují buňky Reedové-Sternberga (RS). U necelé poloviny pacientů s klasickou formou HL byla v RS buňkách prokázána přítomnost genomu EBV, u HIV pozitivních jsou buňky pozitivní na EBV v 100%. Mezi první příznaky patří zvětšení uzlin, hlavně krční, zvýšená teplota, noční pocení, váhový úbytek a občas se může objevit kašel a dušnost (Küppers, a další 2012).

4.2.4 Lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozóm

Lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozóm (XLP) nebo také Duncanova nemoc je vrozená imunodeficience. Toto onemocnění se projevuje při primární infekci EBV u do té doby zdravých chlapců. Imunitní systém není schopen zničit EBV a jeho přítomnost aktivuje zejména cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty, které potom napadají především jaterní buňky. Průběh IM je velmi těžký a doprovází ho fulminantní hepatitida a hematofagocytární syndrom. U chlapců, kteří přežijí, se může rozvinout progresivní hypogamaglobulinemie a B lymfom (Smíšková 2012).

5. Epidemiologie EBV

Podobně jako ostatní herpesviry lidí, je EBV v populaci velmi rozšířený. Protilátky třídy IgG se vyskytují u necelých 90% dospělého obyvatelstva. K sérokonverzi (tj. vytvoření protilátek v organismu) dochází už ve věku 5 let u zhruba poloviny z nich, u lidí, kteří žijí v oblastech s nízkou hygienou, už do věku 18 měsíců. Nejčastěji onemocní mladí lidé (15–24 let), proto je IM často označována jako „nemoc z líbání“. Tito lidé nepřišli do kontaktu s virem v mladším věku, nemoc se u nich buď neprojeví vůbec anebo probíhá jako lehké onemocnění s vysokou teplotou a faryngitidou. U lidí ve věku nad 40 let se onemocnění prakticky nevyskytuje.

K přenosu dochází mezi nemocnými, ale i jedinec s inaparentním průběhem onemocnění může být zdrojem infekce. Virus se šíří těsným kontaktem se sekrety dutiny ústní (sliny) a také kapénkovou infekcí. Přenos pohlavním stykem je možný, ale je méně pravděpodobný, stejně jako přenos přes krevní transfúzi. Onemocnění zanechává dlouhodobou imunitu. Inkubační doba je 30 až 50 dnů. Morbidita IM je odhadována na 50 případů na 100 000 obyvatel (Rajčáni a Čiampor 2006).

6. Léčba neuroinfekcí způsobených EBV

Infekce centrální nervové soustavy (CNS), které jsou propojené s EBV, ještě nejsou důkladně prostudované. Infekce EBV jako příčina neuroinfekcí byla prokázána pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), kdy byl přítomný genom EBV v mozkomíšním moku. Mezi předpokládané možnosti nákazy patří přímá invaze CNS nebo také imunopatogenetické mechanismy. V některých případech může při IM docházet k neurologickým komplikacím, ale někdy se také mohou objevit neurologické příznaky bez projevů IM.

Účinnost antivirotik u neuroinfekcí způsobených EBV nebyla prokázána (Opavský, a další 2008). Podle některých studií bylo zjištěno, že po poklesu množství kopií DNA EBV pod detekční hladinu se objevila mírná zlepšení u neuroinfekcí nebo také, že clearanci (tj. množství krve, které se za určitou dobu očistí od určité látky) DNA EBV z mozkomíšního moku předchází pokles bílých krvinek.

Některé studie naopak neprokazují klíčovou roli EBV v neuroinfekcích, např. magnetická rezonance nebo histopatologické studie, ale mohou potvrdit výskyt některých strukturních změn, které jsou typické pro určité neuroinfekce. Uložení cirkulujících komplexů protilátka-antigen může být považováno za možný spouštěč endoteliálních změn, které vedou k demyelinizaci (tj. poškození myelinových pochev u nervových buněk) a poškození tkáně (Volpi, a další 2013). Některé studie také uvádějí, že pro mnoho malignit spojených s EBV je účinná chemoterapie, ale až 50% lidí, kteří se vyléčí z Hodgkina lymfomu, umírá na komplikace spojenými s chemoterapiemi nebo po relapsu onemocnění (Cohen, a další 2011).

K jiným vysvětlením také patří tvrzení, že neuroinfekce spojené s EBV jsou způsobeny proniknutím cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů do měkkých mozkových plen nebo do nervové tkáně (Volpi, a další 2013).

6.1 Neuroinfekce způsobené EBV

6.1.1 Komplikace CNS při IM

Identifikovat neuroinfekci způsobenou EBV je poměrně obtížné, protože vztah mezi neurologickými potížemi a klasickými příznaky IM je proměnlivý. Analýzy mozkomíšního moku prokázaly, že neurologické příznaky mohou souviset s EBV i v případě, kdy nejsou k dispozici klinické nálezy, které by podporovaly diagnózu IM. Odhadované množství těchto neuroinfekcí je 0,7–26,5 %. Rozsah je velký, protože tyto výsledky pochází také od hospitalizovaných pacientů, skutečný výskyt je odhadován na 1–5%. Mezi nejčastější komplikace patří meningitida a encefalitida (Volpi, a další 2013).

6.1.2 Meningitida

Pacienti s meningitidou, která je spojená s EBV, mají vyšší teplotu, bolesti hlavy, ztuhlý krk a pocit na zvracení. Tlak mozkomíšního moku bývá zvýšený, dochází ke zvýšení koncentrace proteinů a k patologickému zvýšení počtu leukocytů. Koncentrace glukózy a počet bílých krvinek bývá normální. Avšak zvýšený tlak mozkomíšního moku bývá pozorován i u pacientů se symptomatickou IM bez neurologických příznaků. Dále se u některých pacientů mohou objevit změny v syntéze protilátek uvnitř mozkových plen (Volpi, a další 2013). Buňky mozkomíšního moku bývají složeny z různých buněčných populací a nebývají zjištěna žádná genová přeskupení. Stejně tak je tomu i encefalidity (Wu, a další 2013).

6.1.3 Encefalitida

Vědci uvádějí případy encefalidity, která se objevila po EBV virové reaktivaci u imunokompetentních pacientů (Barón, a další 2013). U pacientů, kteří mají encefalidu spojenou s EBV, se objevuje horečka, bolesti hlavy, ztuhlý krk a pocit na zvracení stejně jako u pacientů s meningitidou. Navíc se mohou objevit změny v duševním stavu, člověk bývá podrážděný, dezorientovaný, letargický a může upadnout i do komatu. U jedné třetiny pacientů se vyskytují místní abnormality, jako je například hemiparéza (tj. částečné ochrnutí jedné poloviny těla, které je způsobeno některými neurologickými nemocemi) nebo chorea (tj. nervová porucha, která spočívá v mimovolných rychlých pohybech postihujících různé části těla) (Opavský, a další 2008).

Abnormality mozkomíšního moku jsou stejné jako u pacientů s meningitidou, ale počet buněk může být o něco nižší než u pacientů s meningitidou. Často bývají v mozkomíšním moku detekovány protilátky proti EBV (Barón, a další 2013). U většiny případů bývá počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MRI) normální, někdy se ale může objevit na CT otok nebo léze nebo na MRI atrofie a oblasti se zvýšenou intenzitou signálu v T2 vážených obrazech (Volpi, a další 2013). Diagnóza EBV encefalitidy přichází v úvahu, když klinický obraz pacienta poukazuje na herpetickou encefalitidu, ale pomocí PCR není možné detekovat DNA viru herpes simplex. Nejčastěji bývá používána intravenózní léčba acyklovirem (Barón, a další 2013).

6.1.4 Lymfomy CNS u AIDS

EBV má na svědomí několik různých lymfomů, u pacientů infikovaných HIV do těchto lymfomů zahrnujeme 40–67% non-hodginských lymfomů a většinu Hodgkinovo lymfomů. Výskyt těchto lymfomů je nesrovnatelně vyšší u lidí HIV pozitivních než u běžné populace. U imunokompetentních pacientů bývá výskyt těchto lymfomů vzácný. Je znám případ pacienta, u kterého rychle postupovala slabost s chronickou, zánětlivou demyelinizační polyneuropatií (Volpi, a další 2013). Lymfomy vznikají pravděpodobně reaktivací viru a DNA viru je poté možné detekovat ve všech lymfomech, které jsou spojené s AIDS a stejně tak i v likvoru (Opavský, a další 2008).

Mezi příznaky patří bolesti hlavy, zmatenost, ztráta paměti, hemiparéza, ztráta řeči a záchvaty. Diagnostika lymfomů se opírá nejčastěji o MRI a detekci EBV DNA v likvoru pomocí PCR. Lézí nebývá obvykle mnoho, jsou velké, kontrastní a mívají více ložisek. Můžeme je vidět v mozku, mozkovém kmenu a bazálních gangliích. Tyto příznaky bývají obvykle fatální, většina jedinců umírá během 4 až 6 týdnů od určení diagnózy (Volpi, a další 2013).

Velký podíl pacientů pozitivních na herpesviry mělo infekci HIV, což ukazuje významný vztah mezi přítomností herpesvirů a snížením imunity při AIDS (Nakamichi, a další 2013). V počátečním stádiu se objevují nádory podobné Burkittovým lymfomům a nádory primárního centrálního nervového systému (PCNSL) a periferní non-hodginovské lymfomy se objevují spíše v pozdním stádiu. Všechny tři typy mohou mít spojitost s EBV, ale nejvyšší souvislost, necelých 100%, má PCNSL. DNA EBV můžeme detekovat v mozkomíšním moku (Macswen a Crawford 2003).

Jako terapie u pacientů HIV pozitivních se používá aktivní kombinovaná retrovirová terapie (HAART), cytostatika a radioterapie. Díky tomuto způsobu léčby dochází k mírným zlepšením v už tak špatné prognóze (Opavský, a další 2008).

Kromě lymfomů je také EBV spojováno s ústní vlnatou leukoplakií (OHL). Toto onemocnění se objevuje nejčastěji v pozdním stádiu AIDS. OHL je bezbolestná, objevují se bílé léze na okrajích jazyka. Často se vyskytuje právě u lidí s AIDS, ale byly zaznamenány i některé případy u jedinců s jinou imunopresí. EBV můžeme nalézt v lézích na dlaždicovém epitelu, ale bez maligní transformace. V případě potřeby bývá OHL léčena pomocí acykloviru (Macswen a Crawford 2003).

6.1.5 Posttransplantační lymfoproliferativní onemocnění

Vznik posttransplantačního lymfoproliferativního onemocnění PTLD je vázán na používání na posttransplantační imunoprese, která způsobí nedostatek cytotoxických T-lymfocytů. Tento deficit pak způsobuje to, že nejde zabránit expanzi EBV transformovaných B-lymfocytů. PTLD zahrnuje několik druhů proliferativních onemocnění, kromě CNS postihuje i lymfatické uzliny, játra, plíce, ledviny, kostní dřeň, slezinu slinné žlázy a střeva (Opavský, a další 2008).

Histologie se často velmi liší, jak u jednotlivých pacientů, tak i u jednotlivých orgánů. Na histologickém obrazu můžeme vidět polymorfní lymfocyty, plazmatické buňky nebo monomorfní imunoblasty. Určování diagnózy, zda jde o polymorfní nebo monomorfní PTLD, záleží často na jednotlivci, který diagnózu určuje. Ovšem při postižení CNS mají léze většinou monomorfní a agresivní charakter (Volpi, a další 2013).

Většina případů se vyskytuje do jednoho roku od transplantace orgánů. Po transplantaci ledviny je výskyt lymfomů 1–2%, po transplantaci srdce nebo plic 5–9%. Poslední dobou se ale zvyšuje počet pozdních případů PTLD, většinou 5 let po transplantaci. Mezi nejčastější místa výskytu patří lymfatické uzliny (59%), játra (31%), plíce (29%), ledviny (25%), kostní dřeň (25%), tenké střevo (22%), slezina (21%), CNS (19%), tlusté střevo (14%), mandle (10%) a slinné žlázy (4%) (Volpi, a další 2013).

Klinické příznaky bývají také různé, u zhruba poloviny lidí se objevuje horečka, o něco méně se objevuje lymfadenopatie, gastrointestinální a plicní potíže, potíže CNS a úbytek váhy. Prognóza bývá velmi závažná, 88% lidí umírá během 6 měsíců od určení diagnózy. Podle provedené studie bylo PTLD diagnostikováno pomocí několika markerů: klinické projevy CNS, přítomnost DNA EBV v mozkomíšním moku a cytomorfologický doklad o přítomnosti atypických lymfocytů (Wu, a další 2013). PTLD je podle WHO klasifikováno jako časně léze (plazmatické hyperplazie, IM), polymorfní PTLD, monomorfní PTLD a PTLD s klasickým Hodgkinovým lymfomem (Furuya, a další 2013).

V první linii léčby dochází ke snížení imunosupresivní léčby, to umožní obnovení počtu cytotoxických T-lymfocytů a ve většině případů ústup nádoru. U tohoto způsobu léčby, ale nastává riziko, že jednotlivec nemusí přijmout transplantovaný orgán. Bohužel i přes používání chemoterapií, úmrtnost je pořád stále vysoká (Macswen a Crawford 2003). V roce 1980 bylo zavedeno používání cyklosporinu a o něco později používání nových účinných imunosupresivních léků, jako je anti-CD3 monoklonální OKT3 a FK506 (Volpi, a další 2013).

V poslední době byly testovány nové formy imunoterapie. Rituximab je humanizovaná myší monoklonální protilátka a zaměřuje se na CD20 molekuly, které se nachází na povrchu všech zralých B-lymfocytů. V současné době je povolena pouze léčba CD20 pozitivních difuzních velkobuněčných non-hodginovských lymfomů. Používá se dohromady s chemoterapií nebo samostatně pro folikulární lymfomy, pokud chemoterapie selže. Přesto že má mnoho pozitivních výsledků, dochází k recidivám nádorů (Macswen a Crawford 2003). Za běžnou léčbu na CD20-pozitivní PTLD nereagující na imunosupresi vědci považují sekvenční terapii s rituximabem a CHOP (cyklofosfamid, hydroxydaunorubicin, vinkristin a prednison) (Zimmermann a Trappe 2013).

Pro prevenci a léčbu PTLD při transplantacích kostní dřeně byly použity infuze kultivované EBV, ve kterých se nachází specifické cytotoxické T-lymfocyty. Bohužel je příliš nákladné a časově náročné najít správné dárce se shodným histokompatibilním systémem (HLA), aby mohl být tento způsob léčby využit pro širokou veřejnost. Tento problém by mohl mít řešení ve vyvinutí banky se specifickými cytotoxickými lymfocyty. Zatím má tato kontrolovaná studie pozitivní výsledky a dále se v ní pokračuje. Pokud bude i nadále úspěšná a nevyskytnou se nějaké problémy, mohla by být tato metoda využitelná i pro další infekce (Macswen a Crawford 2003).

6.1.6 Guillain-Barré syndrom

Guillain-Barré syndrom je nejčastější příčinou neuromuskulární paralýzy. Příčiny i patogeneze jsou zatím neznámé, ale u více než poloviny pacientů předcházela tomuto onemocnění infekce, respirační nebo gastrointestinální onemocnění (Rees, a další 1995).

Mezi příznaky patří symetrická svalová slabost, která se rychle rozvíjí, ztráta šlachových reflexů, mírné smyslové znaky a autonomická dysfunkce. Tyto příznaky se objevují několik dní až 4 týdny od virové nebo bakteriální infekce, proto je EBV spojován se Guillain-Barré syndromem. Některé studie ale s touto teorií nesouhlasí, byly zkoumány hladiny protilátek u pacientů s EBV a jen u 8 pacientů ze 100 s Guillain-Barré syndromem byly zjištěny EBV-specifické protilátky IgM. Důkazy, které by spojovaly EBV se Guillain-Barré syndromem, jsou tedy nejednoznačné a k diagnóze jsou potřeby velice citlivé testy na prokázání EBV u pacientů se Guillain-Barré syndromem (Volpi, a další 2013).

6.1.7 Myeloradikulitida a encefalomyeloradikulitida

Myeloradikulitida je zánět míchy a míšních kořenů. Encefalomyeloradikulitida je zánět mozku, míchy a míšních kořenů. Podle studia čtyř pacientů s těmito onemocněními byla zjištěna schopnost viru ovlivňovat více částí z celé nervové soustavy, jako je mozek, mícha, míšní kořeny a periferní nervy. Tato schopnost je doložena několika příznaky, mezi které patří změny duševního stavu, ztuhlý krk, slabost a ztráta citlivosti v důsledku příčné myelitidy (Majid, a další 2002).

V mozkomíšním moku můžeme vidět velké množství buněk, hlavně mononukleární se zvýšeným množstvím proteinu, ale normálním množstvím glukózy. U některých pacientů byl při vyšetřování pomocí MRI zvýšený signál v míše a lumbosakrálních kořenech, u některých pacientů byla MRI normální. V prováděných výzkumech žádný z pacientů nezemřel, ale byly patrné neurologické deficity jako slabost v dolních končetinách a u jednoho pacienta se vyvinula optická neuritida. Ve srovnání s jinými neurologickými onemocněními způsobených jinými herpes viry jsou klinické příznaky EBV myeloradikulitidy a encefalomyeloradikulitidy výrazné (Majid, a další 2002).

6.2 Chronický únavový syndrom

Původ chronického únavového syndromu (CFS) je dosud pro lékaře neznámý. Postihuje přibližně 0,2–0,7% populace v západních zemích. Mezi příznaky patří nevysvětlitelné únavy, které 6 měsíců nebo déle, zhoršení neurokognitivních funkcí, koncentrace, krátkodobé paměti a kvality spánku. Mezi další příznaky také patří opakující se bolest v krku, hlavy, kloubů, svalů a malátnost.

Je předpokládána spojitost s různými viry, jako je například virus chřipky, *Brucella bovis*, *Toxoplasma gondii* a herpesviry nejčastěji EBV a HHV – 6. Bylo popsáno několik různých míst propuknutí epidemií: Los Angeles v roce 1934, Londýn v roce 1955, okolí jezera Tahoe v roce 1980, které se nachází na hranicích států Kalifornie a Nevada. Tyto údaje spolu s klinickými příznaky poukazovali na možnost infekční nákazy. Dále mezi možností nákazy patřil *Borna Disease* virus, který způsoboval neurologické abnormality u teplokrevných živočichů (Evengard a Klimas 2002).

Detekovat DNA EBV nebo HHV – 6 v periferní krvi nebo v séru je obtížné při tomto onemocnění, je to možné buď při akutní primární infekci anebo při reaktivaci. Oba viry mohou způsobit imunosupresi a latentní EBV a HHV – 6 může pozměnit citokiny (Volpi, a další 2013).

Jelikož není onemocnění dostatečně prozkoumané, je celkem obtížné najít vhodnou léčbu. Studie zkoumaly použité antivirové terapie, ale nebyly dostatečně účinné, nicméně acyklovir má vliv na herpesviry. Ohledně léčby proběhlo několik studií, většina léků ale nezabírala na všechny příznaky CFS a řada dalších léků a léčebných terapií je stále zkoumána (Evengard a Klimas 2002).

6.3 Vyhledky pro vakcíny

Na mezinárodním semináři o EBV v roce 2002 byly navrženy dvě vakcíny ke schválení. Nebyly ale řečeny návrhy jak a kdy by se měla vakcína používat (Macswen a Crawford 2003). Prevence onemocnění způsobených EBV pomocí očkování by mělo pozitivní výsledky pro lidi na celém světě (Cohen, a další 2011). Lékaři navrhují, aby prvně dostávaly vakcíny rozvojové země (karcinom nosohltanu v Číně a Burkittův lymfom v Africe), dále by měly být použity na západě k prevenci život neohrožující IM, XLP rodiny a příjemci séronegativních transplantátů (Macswen a Crawford 2003).

Obal virusu, který je složen z glykoproteinu gp340, by měl být použit k vyvinutí vakcíny díky jeho schopnosti indukovat neutralizační protilátky. Tento glykoprotein by se mísil se syntetickým mumaryl dipetidem a poté by mohl být vhodný i pro sériovou výrobu a případné podání pro člověka (Morgan, a další 1989). Glykoprotein gp350 specifická protilátka obsahuje neutralizační aktivitu EBV v séru infikovaných pacientů (Cui, a další 2013). Je možné, že tyto vakcíny budou zmírňovat počáteční replikaci viru a šíření během primární infekce a tím i potlačí masivní reakci cytotoxických T-lymfocytů na antigeny, která vyvolá imunopatologii vedoucí k projevu příznaků. Vakcína prokázala 78% účinnost při prevenci IM, ale ne v prevenci EBV infekce (Cui, a další 2013).

Vakcína EBV je ve vývoji u Medimmune, ale účinnost a mechanismus jsou zatím nejisté. Vakcína na bázi peptidů by měla být výhodná k indukci specifické imunitní odpovědi (Cohen, a další 2011). Vyřešila by problém specifčnosti cytotoxických T-lymfocytů, alelických variací lidských HLA genů a různé epitopy různých kmenů EBV. Další možností by bylo vytvářet terapeutické vakcíny ve formě genetických konstrukcí, které by sloužili k vytvoření a posílení specifické imunitní odpovědi.

Důvod pro prevenci IM pomocí neutralizace virusu nebo snížení replikace virusu po infekci závisí na předpokladu, že množství vakcíny, která je podávána na začátku, je schopno určit závažnost onemocnění. Toto tvrzení ale nebylo potvrzeno dalšími studiemi (Macswen a Crawford 2003). K očkování zdravých jedinců je potřeba velmi účinná a bezpečná vakcína, proto je třeba ještě více prozkoumat patogenezi virusu a sehnat dobrý zvířecí model. V minulosti byl využíván Tamarin, který patří do řádu primátů, pro prevenci nádorů, ten ale není vhodný pro výzkum IM.

Nedávno byl objeven *lymphocryptovirus*, který je podobný EBV. Tento virus se přirozeně vyskytuje u druhu *Rhesus monkey*. Tento objev vypadá slibně, protože virus způsobuje podobné onemocnění jako IM, zda způsobuje virus nádory, se zatím zjišťuje. Do budoucna se očekává, že by tento zvířecí model mohl pomáhat při zkoumání složitosti EBV infekce v oblasti různých onemocnění (Cohen, a další 2011).

Vývoj vakcíny by také usnadnilo identifikování markerů, které předpovídají vývoj ochrany proti EBV infekce, proto by se mělo také zaměřit na zkušenosti získaných ze studií vakcín u jiných virů, které také souvisejí s malignitami, jako je například lidský papilomavirus nebo virus hepatitidy B (Cohen, a další 2011).

7. Vztah EBV k rozvoji roztroušené sklerózy

7.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (MS) je chronické zánětlivé onemocnění CNS, která vede k demyelinizaci a různým formám neurodegenerace. V současné době je málo známo o mechanismech, které způsobují toto onemocnění. Jedním z možných vysvětlení je autoimunita proti antigenům CNS, dalším možným vysvětlení by mohly být přetrvávající infekce CNS nebo jinde v těle, které by spouštěly imunopatologické reakce a to buď přímo anebo pomocí autoimunity. Jedna z možností, který virus by mohl spouštět přetrvávající reakce, je EBV (Lassmann, a další 2011). Mezi další možnosti vzniku MS se zařazuje i vliv životního prostředí, nedostatek vitamínu D a kouření. Prevalence MS se také zvyšuje se zeměpisnou šířkou (Disanto, a další 2012).

MS se může projevovat různými způsoby podle místa poškození mozku. Mezi nejčastější příznaky patří ztráta citlivosti a mravenčení v končetinách. Může dojít k porušení celkové nebo částečné hybnosti a koordinaci pohybů. Dále se objevují poruchy vidění, nekontrolované kmitání očima nebo dvojitě vidění. Jeden z prvních příznaků může být také zánět očního nervu. V tomto případě si nemocný stěžuje na bolest za okem, má rozmazané nebo dvojitě vidění, časté výpadky vidění a špatné vnímání ostrosti barev. V některých případech mohou nastat potíže s plynulou řečí, únava nebo deprese (Pilutti, a další 2014).

7.2 Vztah roztroušené sklerózy a EBV

Tvrzení, zda má EBV vliv na vznik MS, není stále potvrzené, různé studie ukazují různé výsledky. Nedávné studie ukázaly, že existuje jen málo důkazů o přítomnosti EBV v CNS u pacientů s MS. S těmito studiemi kontrastují jiné, které naopak ukazují, že byly přítomny EBV pozitivní buňky a u některých pacientů také folikuly B-lymfocytů, které obsahovaly EBV. Tato otázka, zda EBV hraje opravdu roli při vzniku MS, je velice důležitá, protože tento fakt by mohl pomoci diagnostice a studiu patogeneze MS (Peferoen, a další 2010).

7.2.1 Důkazy o vztahu EBV a roztroušené sklerózy

Před deseti lety byly zveřejněny výsledky analýzy, že EBV-séropozitivní jedinci jsou náchylnější ke vzniku MS. V další studii bylo zjištěno, že čtyřnásobné zvýšení séra anti-EBNA-2 protilátek vede ke čtyřnásobně vyšší pravděpodobnosti vzniku MS. Okolo 90% B-lymfocytů v MS aktivních a chronicky aktivních lézí bílé hmoty a okolo 80% plazmatických buněk infiltrovaných do mozku bylo infikováno EBV. Imunohistochemické detekce latentních a lytických proteinů EBV spolu s přítomností infiltrovaných CD8+ cytotoxických T-lymfocytů nasvědčovalo tomu, že imunitní odpověď na MS aktivní léze je sekundární infekce EBV (Volpi, a další 2013). Sériové studie také prokázaly, že výskyt MS je nižší u lidí, kteří nejsou pozitivní na EBV, ale riziko rozvoje se zvyšuje po EBV infekci. Odhaduje se průměrný interval mezi infekcí a rozvoj MS mezi 5 a 6 lety (Pender 2011).

Nicméně několik dalších studií, které byly provedeny ve stejné době, tuto spojitost nepotvrzují. Výzkum produkce anti-EBV protilátek ve vzorcích mozkomíšního moku od nemocných i zdravých pacientů ukáže negativní výsledky (Willis, a další 2009). Je známo, že se u zdravých jedinců nevyskytují plazmatické buňky v CSF, vyskytují se pouze u pacientů s infekčními nebo zánětlivými onemocněními a produkují protilátky, které jsou namířené proti specifickým antigenům. Plazmatické buňky, které se vyskytují v CSF při MS, jsou generovány pomocí zárodečného zrání, které je řízené antigenem a jsou zdrojem intratekálně syntetizovaných oligoklonálních tyčiček v CSF. Specifičnost rAbs v CSF pravděpodobně duplikuje oligoklonální tyče, které jsou poté namířeny proti antigenům (Volpi, a další 2013).

Také se stále uvažuje o tom, že by EBV měl vliv jen na aktivaci MS, ale na rozvoj by už vliv neměl. EBV využívá řadu mechanismů, jak působit na imunitní systém, včetně molekulární mimikry, kde vlastně napodobuje molekuly, které nejsou organismu cizí, dále indukuje šok tepla u proteinů a superantigenů nebo zabíjí autoreaktivní B-lymfocyty (Borkosky, a další 2012). Chronické přetrvávání EBV v CNS by mohly přímo řídit imunopatologické reakce, které způsobují poškození tkáně u pacientů. EBV je postižena velká většina obyvatelstva, to nejspíš způsobilo, že si vědci už dříve nespojili MS s infekcí EBV (Pender 2011).

Další studie poukazují na to, že EBV nemusí být řádně kontrolovány a tím může dojít k rozvoji infekce a že intracerebrální aktivace infekce může udržet chronický zánětlivý proces vedoucí k MS. Tito vědci objevili vysokou frekvenci buněk infikovaných EBV mezi B-lymfocyty infiltrujícími léze bílé hmoty mozkové pleny a MS, ale už ne v jiných zánětlivých onemocnění CNS. EBV byla zjištěna u 95% zkoumaných vzorků.

Skupina vědců se pokusila vyřešit problém vztahu pomocí PCR a metodologie, shrnuli zkušenosti ze všech laboratoří. Potvrdili shodu, že při polymerázové řetězové reakce technologii je možné snadno detekovat infekci EBV v kontrolní tkáni nebo lymfoblastových buněčných liniích. Nicméně infekce v celých částech nemocného mozku nebo v jednotlivých buňkách izolovaných z CSF se vyskytovala jen zřídka. Pozitivní výsledky byly získány pomocí pre-amplifikačních technik PCR nebo selektivní izolací míst s větším množstvím B-lymfocytů pomocí laserové mikrodisekce (Lassmann, a další 2011).

Vyšší procentu výskytu EBV bylo zaznamenáno i u jiných onemocnění, jako je například non-neurologické onemocnění mozku (46%), Parkinsonova choroba (42%) nebo Alzheimerova choroba (25%) (Lassmann, a další 2011).

Pravděpodobným vysvětlením všech těchto odchylek budou nejspíš rozdílné metody detekce. Bylo prokázáno, že PCR má vyšší senzitivitu a specifčnost než imunohistologické metody detekce (Volpi, a další 2013). Rozdílné výsledky při použití podobných metod mohou být způsobeny různými způsoby zpracování vzorků nebo s nešetrným zacházením s pitevními mozkovými vzorky, aby tkáň byla v optimálním stavu. Vztah mezi MS a EBV nebo případně jiné hypotézy musí být tedy stále více prozkoumávány (Lassmann, a další 2011).

8. Zhodnocení PCR a jiných detekčních metod pro diagnostiku neuroinfekcí

8.1 Diagnostika EBV

Infekce EBV může mít různé klinické příznaky, od méně závažných infekcí, které se dají dobře léčit až po život ohrožující infekce. Sérologické markery jsou nejběžněji používané pro stanovení diagnózy. Sérologické markery pro stanovení infekce EBV jsou protilátky IgG a IgM proti VCA, heterofilní protilátky, protilátky IgG proti EBV early antigen-diffuse (EA-D) a nukleární antigen (EBNA-1). Vědci vytvořili dvě tabulky (tabulka 1), aby zjistili, jestli bylo využito 3 nebo 5 markerů a bylo zjištěno, že tyto tabulky jsou schopny interpretovat více než 95% sérologických výsledků.

Tab. 1: Sérologické vzory pro určení diagnózy EBV infekce

Předpokládaná EBV diagnóza	VCA IgG	VCA IgM	EBNA-1 IgG	EA IgG	Heterofilní protilátky
EBV naivní	-	-	-	-	-
Primárně akutní	-	+	-	+/-	+/-
Předchozí Infekce	+	-	+	-	-
Reaktivace Zotavení	+	+/-	+	+/-	-
Neznámé	+/-	-	+/-	+/-	-

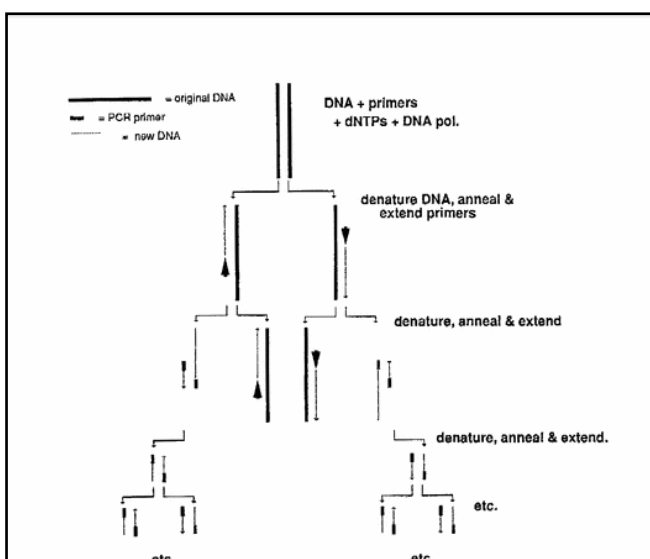
Nádory spojené s EBV jsou charakterizovány vysokými titry proti EA, protilátkami IgG proti VCA a sníženou EBNA. Nicméně tyto sérologické markery nejsou dostačující pro diagnózu. Problém nastává u pacientů s imunosupresí a také v tom, že EBV je po primární infekci přítomná u 90% lidí. Během posledních let pokroky v molekulární biologii umožnili detekovat i minimální množství DNA EBV. V různých laboratořích jsou používány různé metody a techniky k určování diagnóz EBV infekce a výsledky jsou odlišné. Velký problém také nastává u pacientů s transplantovanými orgány, u nich je nejlepším řešením kvantitativní PCR (Volpi, a další 2013).

8.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je revoluční metoda, která byla vyvinuta Karrym Mullisem (Erlich 1989). Celá reakce probíhá v termocykleru, který podle potřeby upravuje teplotu. Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Vzhledem k tomu, DNA polymeráza může přidat nukleotid pouze na dříve existující 3'-OH skupiny, je třeba primer, na které se může přidat na první nukleotid. Testování mozkomíšního moku pomocí PCR je dnes běžná metoda při určování diagnózy u neuroinfekcí (Nakamichi, a další 2013).

8.2.1 Základní princip PCR

Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky: denaturace, hybridizace (dosednutí primerů) a elongace, extenze a syntetická fáze. Nejprve se DNA krátce zahřeje na 90°C a poté zchladí na 60°C za přítomnosti nadbytku primerů, ty pak hybridizují s komplementární jednořetězcovou DNA. Druhý řetězec je pak dosyntetizován termorezistentní DNA polymerázou. Nově syntetizovaný DNA duplex je separován zahřátím a cyklus se opakuje. V každém cyklu se zdvojí vždy příslušná sekvence DNA. Tato sekvence může být pomnožená až milionkrát během 25 cyklů (Erlich 1989). Zjednodušené schéma můžeme vidět na obrázku 5.



Obr. 5: Schéma PCR (Erlich 1989).

8.2.2 Použití PCR při detekci EBV

Studie EBV z důvodu nedostatku běžných kultivačních technik. Dříve byla diagnóza EBV závislá jen na sérologických testech, ale sérologie je pouze nepřímý marker a je obtížné zjistit přítomnost imunosuprese, tyto problémy pak způsobovaly nesprávné pochopení patogeneze i onemocnění, způsobených EBV (Telenti, a další 1990). Dá se říct, že tyto problémy pomohla vyřešit PCR, ta dokáže identifikovat i malé množství virových sekvencí DNA v krvi i jiných vzorcích. Často bývá metoda PCR využívána s magnetickou rezonancí, použití obou metod vede k nejlepšímu rozeznání onemocnění (Nakamichi, a další 2013).

Hlavní výhodou je její vysoká citlivost. Pro pomnožení určité sekvence stačí velmi malé množství EBV v konkrétním vzorku. Využívá se toho, že PCR funguje jen v případě, když na templátová vlákna nasednou primery. Tím je možno vir v krvi pacienta, protože genetická informace mikroorganismů se liší od lidské, takže je možné navrhnout primery, které budou fungovat pouze v případě, když se v krvi pacienta objeví DNA viru.

Pokud chceme určit typ latence EBV u infikovaných buněk, vzorek exprese virové genetické informace musí být analyzován pomocí různých technik. Jednou z nich je reverzní transkripce-PCR (RT-PCR). RT-PCR je citlivá metoda, které se běžně používá k detekci virové genové exprese. Ale je časově a pracovně náročná. Navíc je toho málo známo o kvantitativní úrovni transkripce EBV latentních genů v buňkách, které byly infikovány virem. Kvantitativní rozdíly v EBV genové expresi souvisí s patogenezi chorob, které jsou spojené s EBV a mohly by tedy poskytnout smysluplné informace o prognóze a terapii (Kubota, a další 2008). Další informace o virové genové expresi by mohly pomoci lépe posoudit stav pacienta, také by měla být zkoumána exprese EBV genu u příjemců transplantovaných orgánů.

Vyhodnocení specifické buněčné imunity u EBV je výhodné pro další vývoj onemocnění spojených s EBV. Analýza lidského leukocytového antigenu I. třídy je rychlý způsob, jak kvantifikovat specifické cytotoxické T-lymfocyty. Pomocí tetramerových testů může řada odborníků posuzovat EBV specifické cytotoxické T-lymfocyty u pacientů s transplantovanými orgány. To může zlepšit předpovědi pacientů s PTLD (Volpi, a další 2013). Často bývá s PCR využívána také magnetická rezonance (MRI). MRI je zobrazovací metoda, která se využívá k zobrazování vnitřních orgánů. Získáváme řezy určité části a ty dále spojujeme až ve 3D obraz. Magnetická rezonance využívá velké magnetické pole a elektromagnetické vlnění s vysokou frekvencí (Edelman a Warach 1993).

9. Úskalí laboratorní diagnostiky neuroinfekcí způsobených EBV

Problémem při použití citlivých technik, jako je PCR, je možnost kontaminace vzorku tkáně při přípravě tak malého množství. V laboratořích si všimli, že k častému znečištění dochází při tkáňové homogenizaci. Tento problém často způsobí falešně pozitivní vzorky. Řešení je takové, že vzorek musí být výhradně ze sterilní tkáně a musí být přenesen do sterilní plastové trubky. Tato úprava výrazně snížila výskyt falešně pozitivních vzorků (Saito, a další 1989). Velký důraz musí být také na speciální nároky odběr vzorku.

Pokud používáme při PCR Taq-polymerázu, má PCR svá omezení. Taq-polymeráza nemá korektorskou aktivitu, takže při syntéze nového vlákna může udělat chyby. A protože v PCR je produkt vždy od předchozího cyklu, tyto chyby se nahromadí. Tuto nevýhodu můžeme obejít použitím termostabilní polymerázy, která je ale méně výkonná, proto se často používají směsi Taq-polymerázy a termostabilní polymerázy s korektorskou aktivitou, ty se pak vzájemně doplňují (Chesky, a další 2000).

Výhodou PCR je to, že metoda je také rychlá a méně invazivní, což je příjemnější pro pacienty, zkrátí se jim pobyt v nemocnici a nejsou potřeba agresivní terapeutická opatření. Mnoho laboratoří udává, že zavedením molekulárních technik a hlavně PCR se výrazně zlepšila diagnostika encefalitidy a meningitidy. PCR má velký potenciál pro diagnózu CNS, ale stále přetrvávají potíže při vyšetřování pacientů s oslabenou imunitou (Chesky, a další 2000).

Také pořad není zcela jasné, jaké vzorky mají být vlastně testovány, aby byly výsledky správné, jestli mononukleární buňky periferní krve, periferní krev, plazmu nebo sérum (Volpi, a další 2013).

Velkou výhodou MRI je, jedinec nenese žádná rizika způsobená zářením. Nevýhodou MRI je určitá hlučnost zařízení, možnou komplikací je také alergická reakce na kontrastní látku, ale pravděpodobnost, že vznikne je velmi nízká (Edelman a Warach 1993).

10. Diskuze

Jak už bylo řečeno spojení mezi EBV a neuroinfekcemi nebylo ještě dostatečně prostudováno, stejně jako propojení EBV a roztroušené sklerózy. Je velmi důležité zjistit, do jaké míry EBV ovlivňuje tato onemocnění ať už pro lepší a rychlejší diagnostiku nebo pro zjištění více informací o patogenezi a šíření virusu a samozřejmě následné léčby a objevení účinné a bezpečné vakcíny (Peferoen, a další 2010). Prognóza u těchto onemocnění bývá závažná, takže je určitě velmi žádoucí, že se vakcíny začaly testovat. V určitých případech například při výskytu lymfomů v rozvojových zemích by zřejmě pomohlo i zlepšení lékařské péče v těchto zemích a případné pozorování dětí, u kterých byl imunitní systém aktivován malárií.

U jedinců, kteří jsou HIV pozitivní, se využívá aktivní kombinovaná retrovirová terapie HAART v kombinaci s cytostatiky a radioterapií (Opavský, a další 2008). Jako léčba PTLD se nejprve využívá snížení imunosupresivní látky, to ale může způsobit, že jedinec nepřijme transplantovaný orgán. I proto jsou v poslední době testovány nové formy imunoterapie. Jeden z nich je rituximab, ten se zaměřuje na CD20 molekuly, které se nachází na povrchu všech B-lymfocytů. Pro prevenci a léčbu PTLD při transplantacích kostní dřeně byly využívány infuze kultivované EBV, ve kterých se nachází specifické cytotoxické T-lymfocyty (Macswen a Crawford 2003). Podle mě by mohl mít tento způsob léčby budoucnost i s vytvořením banky se specifickými cytotoxickými lymfocyty, bohužel bude nejspíš ještě nějakou dobu trvat, aby mohl být využit pro širokou veřejnost.

Určitě je také správné a žádoucí, že se začali testovat různé vakcíny, které by sloužily jako prevence infekce EBV. Vakcíny z glykoproteinu gp340 nebo z glykoproteinu gp350 by měly zmírňovat replikaci a šíření virusu. Vakcína ale zatím prokazuje účinnost pouze při zabránění projevů IM a ne při prevenci infekce EBV (Cui, a další 2013). K dalšímu rozvoji objevování vakcín by měl pomoci i dobrý zvířecí model nebo studium vakcín u jiných virusů, které také souvisejí s malignitami (Cohen, a další 2011).

Roztroušená skleróza by podle mě také mohla být spojená s EBV. Některé studie toto tvrzení podporují a jiné vyvracejí. Bylo prováděno a stále je prováděno spousta studií, které se tímto problémem zabývají. Studie také prokázaly, že výskyt MS je nižší u lidí, kteří nejsou pozitivní na EBV, ovšem EBV je rozšířeno u 90% populace, takže toto tvrzení platí jen přibližně 10 % lidí (Pender 2011). Také se stále uvažuje o tom, že by EBV měl vliv jen na aktivaci MS, ale na rozvoj by už vliv neměl. Tento vztah nebo případně i jiné hypotézy by tedy měly být studovány více do hloubky.

Pokroky molekulární biologie a vynalezení nových a nových detekčních metod usnadňuje lékařům i vědcům jejich práci. Používáním PCR se zlepšila diagnostika neuroinfekcí. Mezi její výhody patří určitě její vysoká citlivost, dokáže identifikovat i velmi malé množství virové DNA. Tyto metody jsou také méně invazivní, což je výhodou hlavně pro pacienty (Chesky, a další 2000). Pomocí pokroků v molekulární biologii jistě brzy vědci objeví nové způsoby léčby onemocnění, které jsou způsobené EBV, ale i jiných.

11. Závěr

Infekce EBV je v dnešní době velmi rozšířená, a proto je důležité se zabývat jak samotnou infekcí, tak šířením virusu a samozřejmě jeho léčbou. Protilátky třídy IgG má až 90% lidí na světě. Člověk se většinou prvně setkává s virem už v raném dětství a to bez projevu onemocnění, k projevu dochází nejčastěji v období dospívání. Virus má schopnost přetrvávat v těle v latentní fázi a za určitých podmínek bývá reaktivován. Tato schopnost se vyskytuje i u jiných herpesvirů.

Virus se šíří těsným kontaktem se sekrety dutiny ústní, tedy slinami, proto je infekční mononukleóza často nazývána nemocí z líbání, nakazí se nejčastěji mladí lidé. K přenosu dochází mezi nemocnými lidmi, ale i jedinec, u kterého se nemoc neprojevuje, může být zdrojem infekce. EBV může způsobovat slizniční a kožní léze, ale také život ohrožující infekce a bývá spojován s několika druhy malignit. Nejznámější a nejtypičtější onemocnění EBV je infekční mononukleóza. U afrických dětí, jejichž imunitní systém je před infekcí aktivován malárií, EBV způsobuje Burkittův lymfom. Jedná se o nádor lymfatických uzlin. Mezi další malignity patří nasofaryngeální lymfom. Ten je rozšířený v jižní Číně a jihovýchodní Asii a virus napadá převážně epitelové buňky. Mezi lymfoproliferativní onemocnění patří Hodgkinův lymfom, i ten bývá spojován s EBV. Další onemocnění, které je způsobováno EBV, je lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozóm. Je to vrozená imunodeficience a projevuje se po primární infekci EBV u do té doby zdravých chlapců.

Infekce CNS spojené s EBV zatím nejsou důkladně prostudované. Podle některých studií dochází ke zlepšení neuroinfekcí po poklesu množství EBV DNA po detekční hladinu. Některé studie zase neprokazují výraznou roli EBV při neuroinfekcích. Mezi tyto neuroinfekce patří meningitida a encefalitida. Buňky mozkomíšního moku bývají složené z různých buněčných populací a nebývají zjištěna žádná genová přeskupení. Jsou uváděny případy, které se objeví po virové reaktivaci. Nejčastější léčbou je léčba acyklovirem. V mozkomíšním moku bývají detekovány protilátky proti EBV. EBV má na svědomí několik různých lymfomů, u pacientů HIV pozitivních je výskyt těchto lymfomů vyšší. Jako terapie u pacientů HIV pozitivních se používá aktivní kombinovaná retrovirová terapie (HAART), cytostatika a radioterapie.

Vznik posttransplantačního lymfoproliferativního onemocnění PTLD je vázán na používání na posttransplantační imunoprese, která způsobí nedostatek cytotoxických T-lymfocytů, pak nejde zabránit expanzi EBV transformovaných B-lymfocytů. Jako léčba se používá snížení imunopresivní léčby, ale zde nastává riziko, že jedinec nemusí přijmout transplantovaný orgán. V poslední době byly testovány nové formy imunoterapie, výsledky mají dobré, ale v některých případech dochází k recidivám nádorů. Mezi další onemocnění patří Guillain-Barré syndrom. Mezi příznaky patří dlouhotrvající nevysvětlitelné únavy, které přichází přibližně 4 týdny po infekci.

Prevence onemocnění způsobených EBV pomocí očkování by mělo pozitivní výsledky pro lidi na celém světě. K vyvinutí vakcíny se používá glykoprotein gp340 nebo glykoprotein gp350. K očkování zdravých jedinců je potřeba důkladně prozkoumaná a bezpečná vakcína, proto je důležité ještě více prozkoumat patogenezi viru a k tomu je potřeba dobrý zvířecí model.

Roztroušená skleróza je chronické zánětlivé onemocnění CNS, stále není potvrzená spojitost mezi roztroušenou sklerózou a virem EBV. Také se stále uvažuje o tom, že by EBV měl vliv jen na aktivaci MS, ale na rozvoj by už vliv neměl. Zjištění, jestli hraje EBV roli při rozvoji roztroušené sklerózy, by bylo klíčové při diagnostice, studiu patogeneze a léčby roztroušené sklerózy.

K detekci EBV byly dříve využívány především sérologické markery. Pokroky v molekulární biologii umožnili detekovat i minimální množství DNA EBV pomocí polymerázové řetězové reakce. Často je využívána dohromady s magnetickou rezonancí. K určení typu latence EBV u infikovaných buněk je využívána reverzní transkripce-PCR. Tyto metody jsou rychlé a méně invazivní, což je příjemnější hlavně pro pacienty.

12. Seznam použité literatury

- Barón, J., S. Herrero-Velázquez, M. Ruiz-Piñero, M. I. Pedraza, S. Rojo-Rello, a Á.L. Guerrero-Peral. „Encephalitis due to the Epstein-Barr virus: a description of a clinical case and review of the literature.“ *Rev. Neurol.*, 16. November 2013: 451-454.
- Borkosky, S. S., C. Whitley, A. Kopp-Schneider, H. Hausen, a E. deVilliers. „Epstein-Barr Virus Stimulates Torque Teno Virus Replication: A Possible Relationship to Multiple Sclerosis.“ *P. LoS. One.*, 2012: 1-9.
- Chesky, M., R. Scalco, L. Failace, S. Read, a L. F. Jobim. „Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and Encephalitis.“ *Arq Neuropsiquiatr*, 2000: 836-842.
- Cohen, J. I., A. S. Fauci, H. Varmus, a J. G. Nabel. „Epstein-Barr Virus: An Important Vaccine Target for Cancer Prevention.“ *Sci Transl Med*, 2. November 2011.
- Cui, X, a další. „A novel tetrameric gp3501–470 as a potential Epstein–Barr virus vaccine.“ *Vaccine* 31, 2013: 3039-3045.
- Disanto, G., a další. „Epstein–Barr virus, latitude and multiple sclerosis.“ *Multiple Sclerosis Journal*, 2012: 362-365.
- Edelman, R. R., a S. Warach. „Magnetic Resonance Imaging.“ *The New England Journal of Medicine*, 11. March 1993: 708-716.
- Epstein, M. A., M.D., G., M.D. Henle, B. G., M.B., B.Ch. Achong, a Y. M. Barr. „Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's.“ 1. December 1964: 56-59.
- Erlich, H. A. „Polymerase chain reaction.“ *Journal of Clinical Immunology*, 11. September 1989: 437-438.
- Evengard, B., a N. Klimas. „Chronic Fatigue Syndrome: Probable Pathogenesis and Possible Treatments.“ *Drugs.*, 2002: 2433-2446.
- Furuya, A., a další. „Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder occurring after bone marrow transplantation for aplastic anemia in Down's syndrome.“ *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 15. December 2013: 438-442.
- Kubota, N., a další. „One-step multiplex real-time PCR assay to analyse the latency patterns of Epstein-Barr virus infection.“ *Journal of Virological Methods*, 2008: 26-36.

- Küppers, R., A. Engert, a M. Hansmann. „Hodgin lymphoma.“ *J Clin Invest.*, 1. October 2012: 3439-3447.
- Lassmann, H., G. Niedobitek, F. Aloisi, a J. M. Middeldorp. „Epstein–Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue—report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria.“ *Brain A Journal Of Neurology*, 2011: 1-15.
- Macswen, K. F., a D. H. Crawford. „Epstein-Barr virus recent advances.“ *The Lancet Infectious Diseases*, 2003: 131-140.
- Majid, A., a další. „Epstein-Barr virus myeloradiculitis and encephalomyeloradiculitis.“ *Brain.*, 2002: 159-165.
- Morgan, A. J., A. C. Allison, S. Finerty, F. T. Scullion, N. E. Byars, a M.A. Epstein. „Validation of a first-generation Epstein-Barr virus vaccine preparation suitable for human use.“ *J. Med. Virol.*, September. 29 1989: 74-78.
- Nakamichi, K., N. Inoue, T. Shimokawa, I. Kurane, Ch. Lim, a M. Saijo. „Detection of human herpesviruses in the cerebrospinal fluid from patients diagnosed with or suspected of having progressive multifocal leukoencephalopathy.“ *BMC Neurol.*, 2013: 1-7.
- Opavský, R. MUDr., R. doc. MUDr. Ph.D. Herzig, a P. prof. MUDr. CSc. Kaňovský. „Herpetické infekce centrální nervové soustavy.“ *Neurol. prax*, 2008: 107-110.
- Peferoen, L. A. N., a další. „Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis.“ *Brain A Journal Of Neurology*, 2010: 1-4.
- Pender, M. P. „The Essential Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis.“ *Neuroscientist.*, 2011: 351-367.
- Perkins, A. S., a J. W. Friedberg. „Burkitt Lymphoma in Adults.“ *ASH Education Book*, 1. January 2008: 341-348.
- Pilutti, L. A., D. Dlugonski, B. M. Sandroff, L. Klaren, a R.W. Motl. „Randomized controlled trial of a behavioral intervention targeting symptoms and physical activity in multiple sclerosis.“ *Multiple Sclerosis Journal*, 2014: 594-601.
- Rajčáni, J., a F. Čiampor. *Lékařská virológiá*. Bratislava: Slovenská akadémia vied, 2006.

Rees, Jeremy H., Ph.D., M.R.C.P., Sara E., B.Sc. Soundain, Norman A., Ph.D. Gregson, a Richard A.C., M.D. Hughes. „Campylobacter jejuni infection and Guillan-Barré syndrome.“ *The New England Journal Of Medicine*, 23. November 1995: 1374-1379.

Saito, Ischiro, Bo Servenius, Teresa Compton, a Robert I. Fox. „Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjorgen's syndrome.“ *J. Exp. Med.*, 1. June 1989: 2191-2198.

Smíšková, Dita, MUDr. „Infekční mononukleóza a další onemocnění vyvolaná virem Epsteina a Barrové.“ *Interní Med.*, 2012: 261-263.

Sugden, Rickinson, a Kieff. „DNA Viruses - Herpesviruses II (EBV).“ *Sem. Virol.* 5, 1994: 197-205.

Telenti, A., W. F. Marshall, a T. F. Smith. „Detection of Epstein-Barr Virus by Polymerase Chain Reaction.“ *Journal of Clinical Microbiology*, 1990: 2187-2190.

Volpi, A., F. Pica, In: Singh S.K., a D. Růžek. *Neuroviral infection: General Principles and DNA viruses*. Boca Raton: CRC Press, 2013.

Willis, S. N., a další. „Epstein–Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain.“ *Brain.*, 2009: 3318-3328.

Wu, M., a další. „Herpesvirus-associated central nervous system diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.“ *PLoS One*, 4. October 2013.

Xie, Chuan-miao, a další. „Primary nasopharyngeal non-Hodgin's lymphoma: imaging patterns on MR paging.“ *Clinical Imaging*, May-June 2013: 458-464.

Zimmermann, H., a R.U. Trappe. „EBV and posttransplantation lymphoproliferative disease: what to do?“ *Hematology Am Soc. Hematol. Educ. Program*, 2013: 95-102.

12.1 Seznam zdrojů ilustrací

[1] https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/The_Role_of_Viral_Proteins_in_Epstein-Barr_Virus_Induced_Disease

[2] http://en.wikipedia.org/wiki/Infectious_mononucleosis

[3] <http://www.medical-terms-glossary.com/Ba-Bz/burkitt-lymphoma.html>

[4] <http://www.ghorayeb.com/NasopharyngealLymphoma.html>