



Epstein-Barr Virüs (EBV) Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Dr.Saliha Sanem Geçgel

HERPESVIRIDAE

Alfa herpesvirinae

HSV tip 1

HSV tip 2

VZV

Beta herpesvirinae

CMV

HHV 6

HHV 7

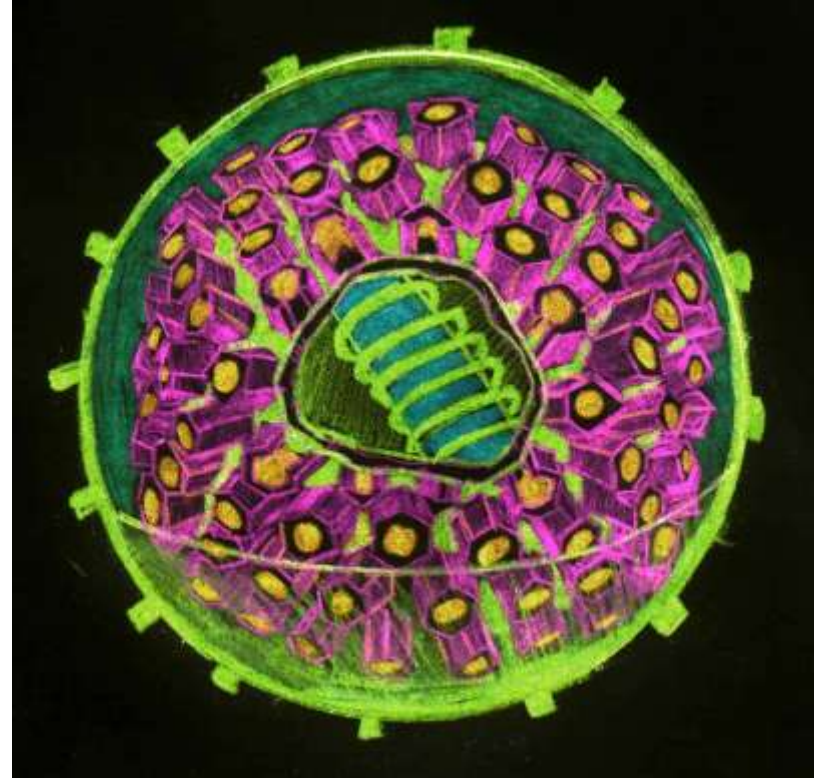
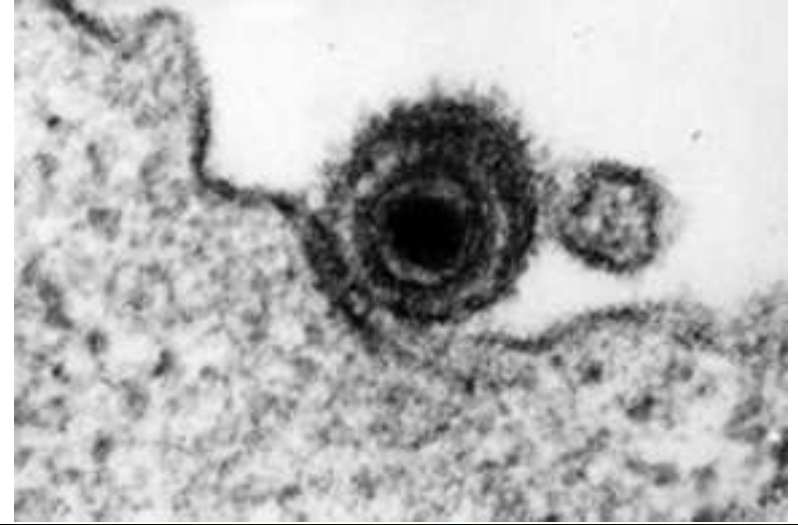
Gama herpesvirinae

HHV 8

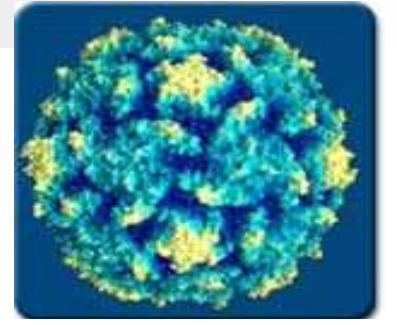
EBV

EBV yapısı

- Gama herpesvirinae ailesi
- Dar konak özgüllüğü
 - İnsan B lenfositleri
 - Nazofarengeal epitel hücreleri
- Antijenleri
 - VCA
 - EA
 - EBNA



EBV yapısı



Epstein-Barr virüs

Zarf

Viral antijenlerin eklendiği konak hücre sitoplazması

Kapsid

Polihedral kapsomer yapısında viral protein

Enfekte B hücrelerinin sitoplazmasında oluşur

Viral kapsid antijen (VCA)

Çift sarmal DNA

Konak B hücresinin nükleusunda replike olur

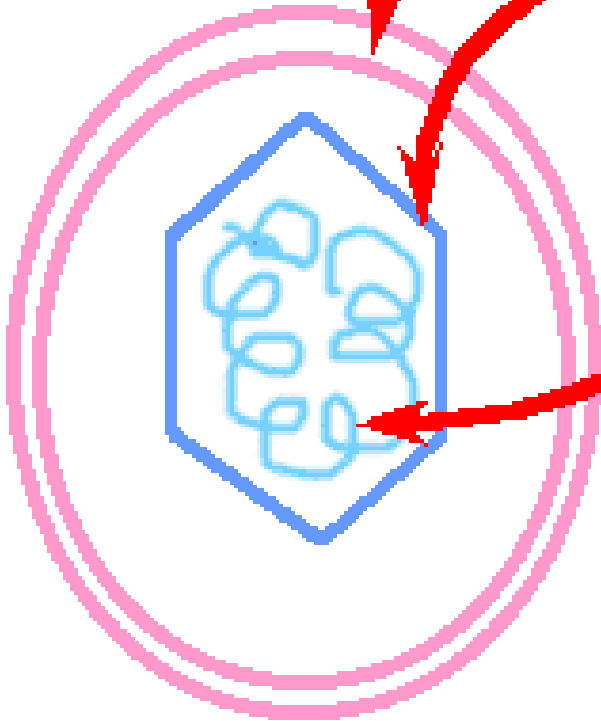
EB-nükleer antijeni (EBNA)

Early antijen

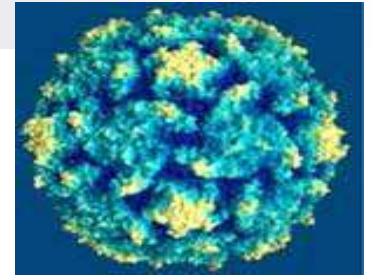
İki komponentten oluşan kompleks

EA-D (yaygın- enfekte hücrenin nükleus ve sitoplazmasında)

EA-R (kısıtlı- sadece sitoplazmada)

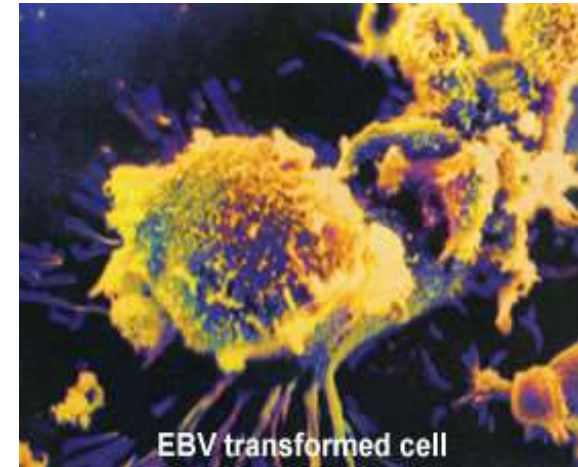


EBV



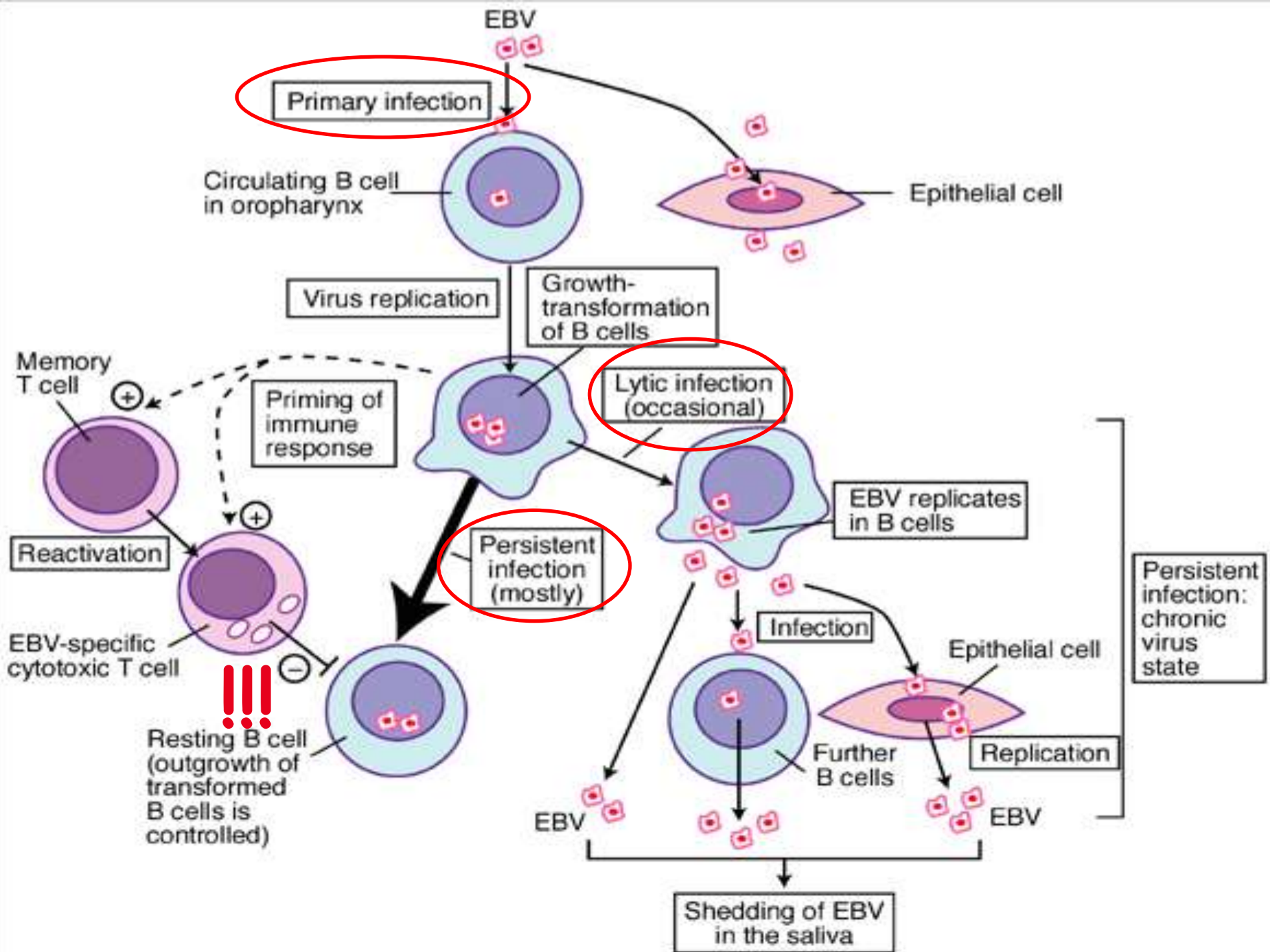
- ❖ EBV replike olduğu hücreye sitopatik etki yapmaz
- ❖ EBV ile enfekte olup virüs genomunu içeren hücre devamlı üreme özelliği kazanır

- Litik enfeksiyon
- Latent enfeksiyon
- Transformasyona neden olabilen enfeksiyon



EBV

- EBV ile farklı enfeksiyon paternleri gelişir
- Prodüktif enfeksiyon ; differansiye epitel hücrelerinde oluşur
- Latent enfeksiyon ; B lenfositleri
- Transformasyon ; B lenfositleri



EBV enfeksiyonları

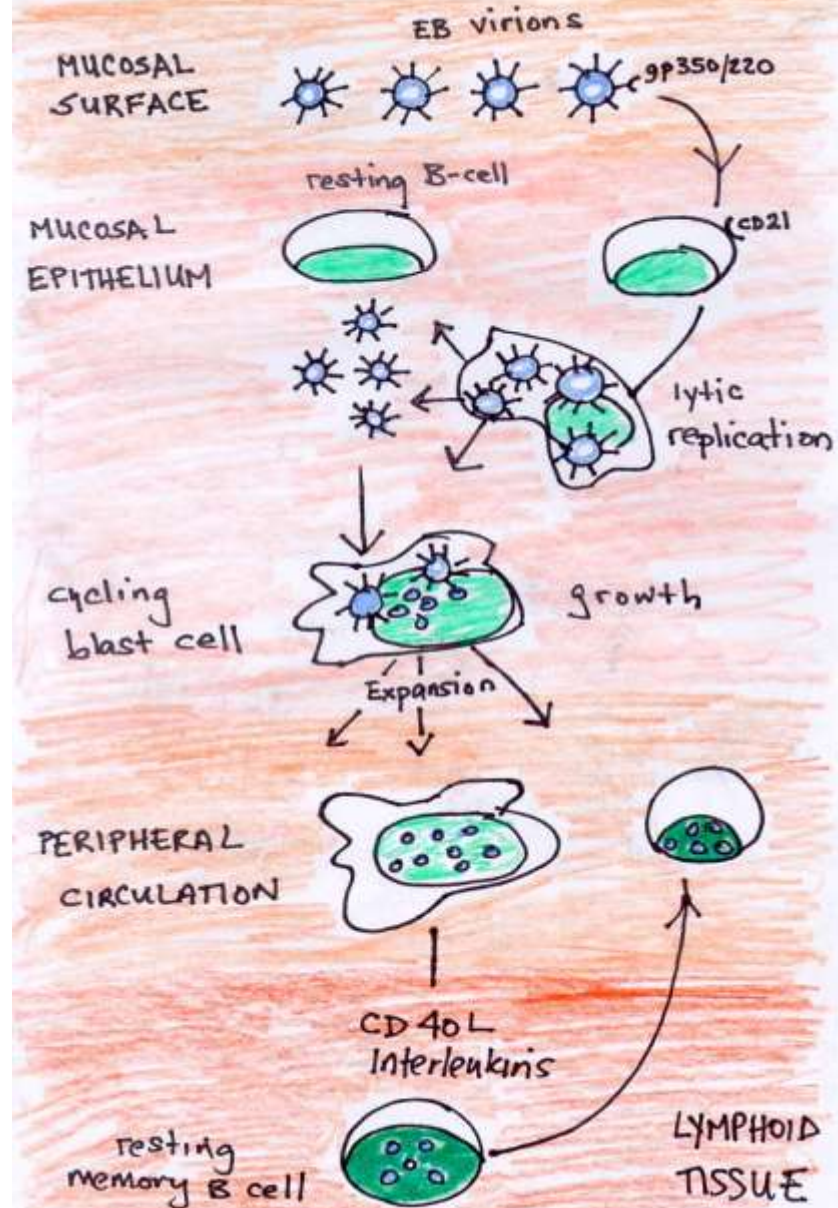
EBV(gp350/220)

B lenfosit(CD21)

Viral DNA

Viral proteinler ve EBNA

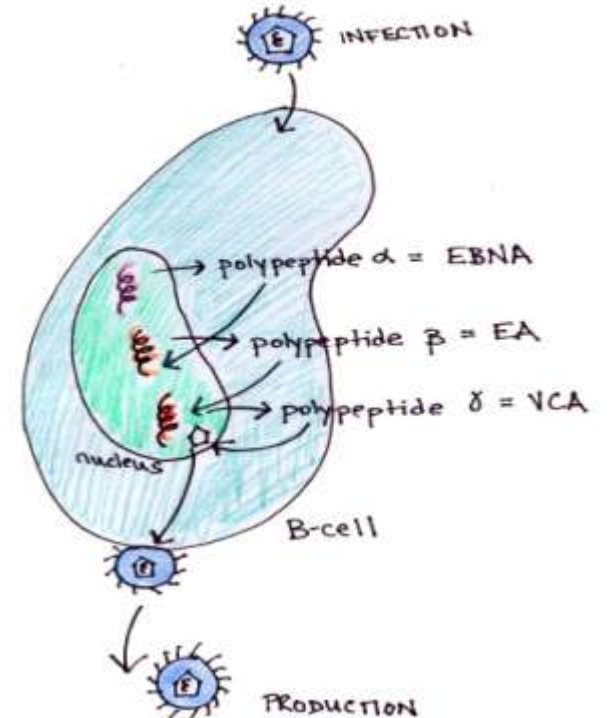
VIRAL ENTRY



EBV - Replikasyon

- Enfeksiyondan kısa süre sonra az sayıda erken gen aktive olur
- Çoğu DNA sentezini regüle eder
- Ayrıca
 - EBNA-1
 - EBNA-2
 - EBNA-3
 - EBNA-3B
 - EBNA-3C
 - EBNA-LP
 - ✓ EA-1,EA-2
 - ✓ Viral DNA polimeraz
 - ✓ Timidin kinazı kapsar

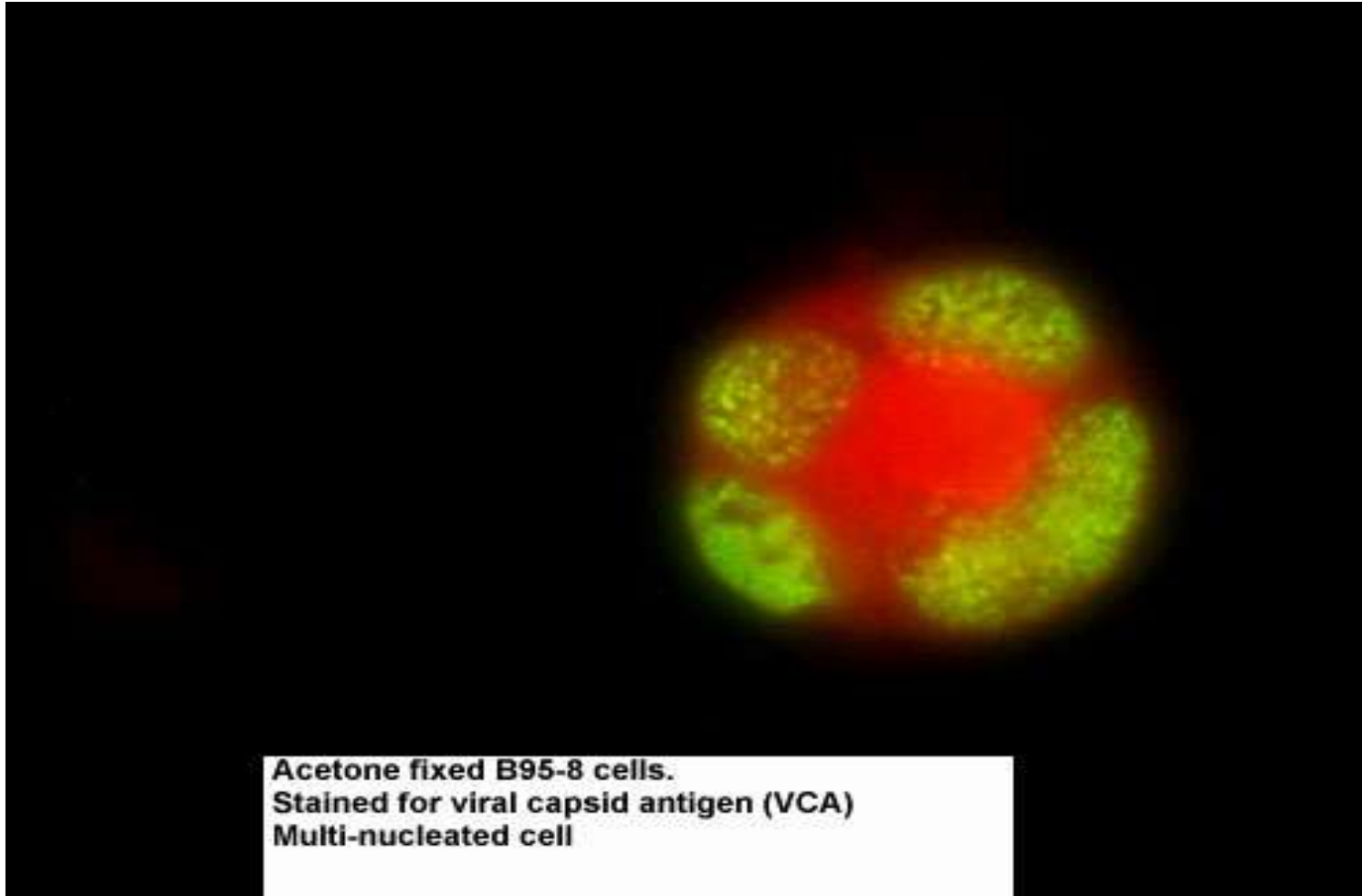
SYNTHESIS OF VIRAL ANTIGENS

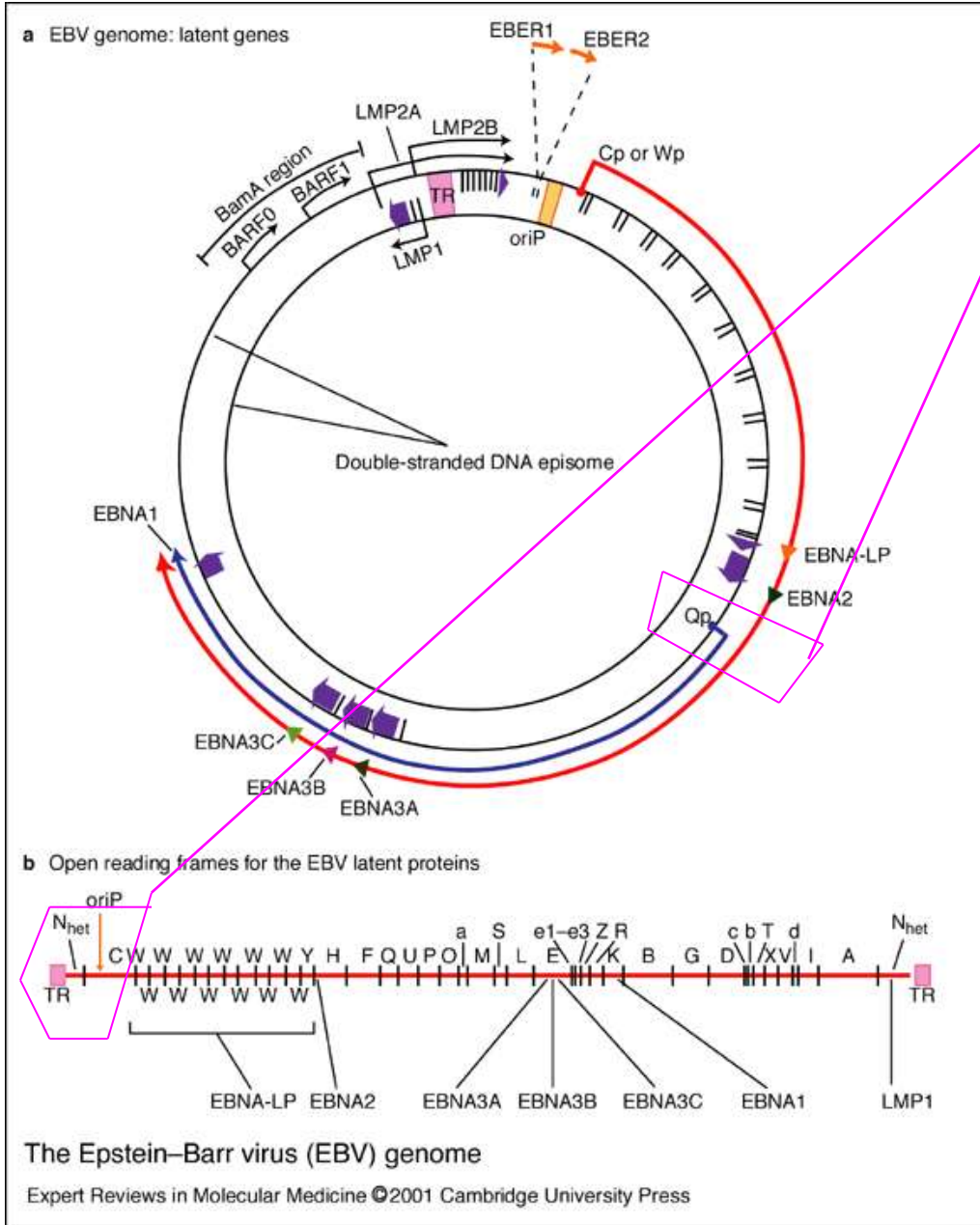


EBV - Replikasyon

- Genomun replikasyonundan sonra **viral yapısal komponentleri** kodlayan genler aktive olur
- Virüs üreten hücrelerde **en fazla VCA** saptanır
- Membran antijenleri(→oluşan antikorlar nötralizan özellikte) ; gp350/220
- BZLF1 tarafından kodlanan replikasyon aktivatör ; ZEBRA

Viral kapsid antijen (VCA)





- EBNA-1 viral genomun replikasyon bölgesinde bağlıdır(oriP)

- EBV genomu, **latent enfekte hücrelerde** otonom replikasyon özelliğinde bir veya çok sayıda **sirküler epizom** olarak bulunur

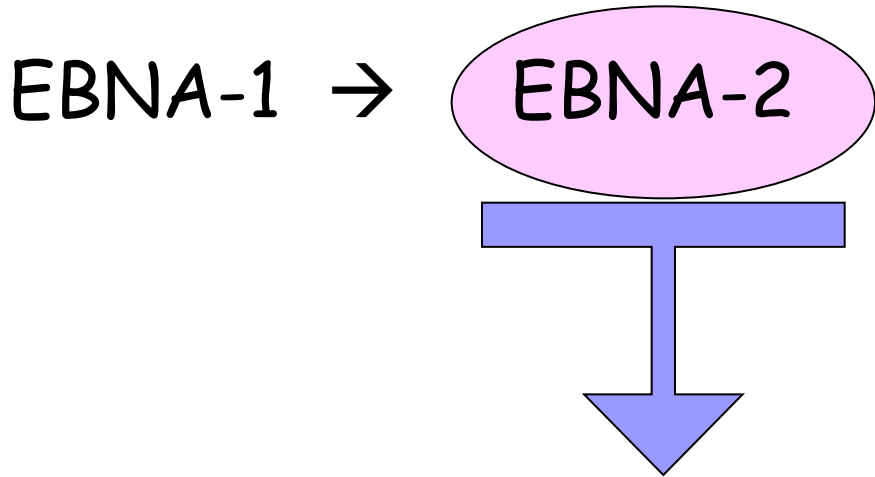
- Latent süreç 11 viral genin transkripsiyonu ile sürer ;

6 EBNA

3 LMP

2 EBV tarafından kodlanan

RNA(EBER)



LMP-1, LMP-2

B lenfosit gen ürünleri (CD21, CD23, c-fgr)

LMP-1 epitel hücreleri ve B lenfositlerinin transformasyonunda ve EBV'ye bağlı onkogeneizde önemli rolü vardır

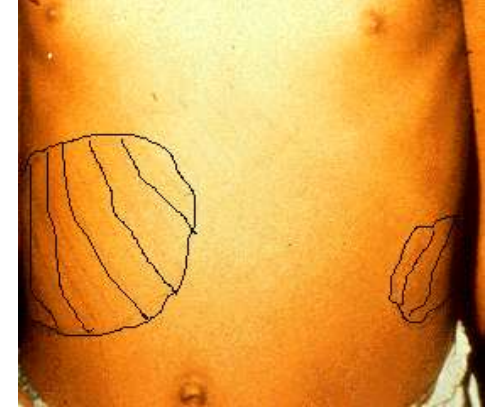
EBV

EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2	EBER	Kanser tipi
+	-	-	-	-	+	Burkitt lenfoma
+	-	-	+	+	+	Nazofarinks kanseri, HH, T hücreli lenfoma, Kronik aktif EBV enf
+	+	+	+	+	+	Lenfoproliferatif hastalık, X'e bağlı lenfoproliferatif hastalık, IMN
-	-	-	-	-	+	Sağlıklı taşıyıcı

EBV ve sorumlu tutulduğu hastalıklar

- Enfeksiyöz mononükleoz
- Burkitt lenfoma
- Nazofarengeal karsinoma
- Hodgkin lenfoma
- İmmünpromize hastalarda gelişen lenfoproliferatif hastalıklar
- Bazı T hücre lenfomaları
- Gastrik karsinomlar
- Tonsil karsinomu
- Supraglottik laringeal karsinom
- Timik karsinom
- Tükruk bezi karsinomları
- Geniş granüler lenfositik lösemi

Enfeksiyöz Mononükleoz - Klinik



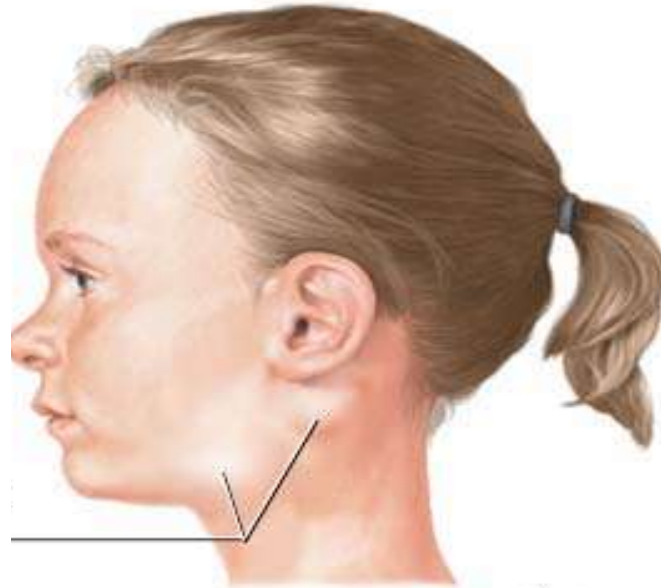
Mononükleoz:

Ateş

Halsizlik

Boğaz ağrısı

LAP



EBV Epidemiyoloji

- Seropozitif sağlıklı bireylerin %10-20
- Renal transplant alıcılarının %50-70
- Hematolojik maligniteli hastaların %70-90
- HIV ile enfekte hastaların %50'sinin

Orofarenksinde EBV izole edilmiştir



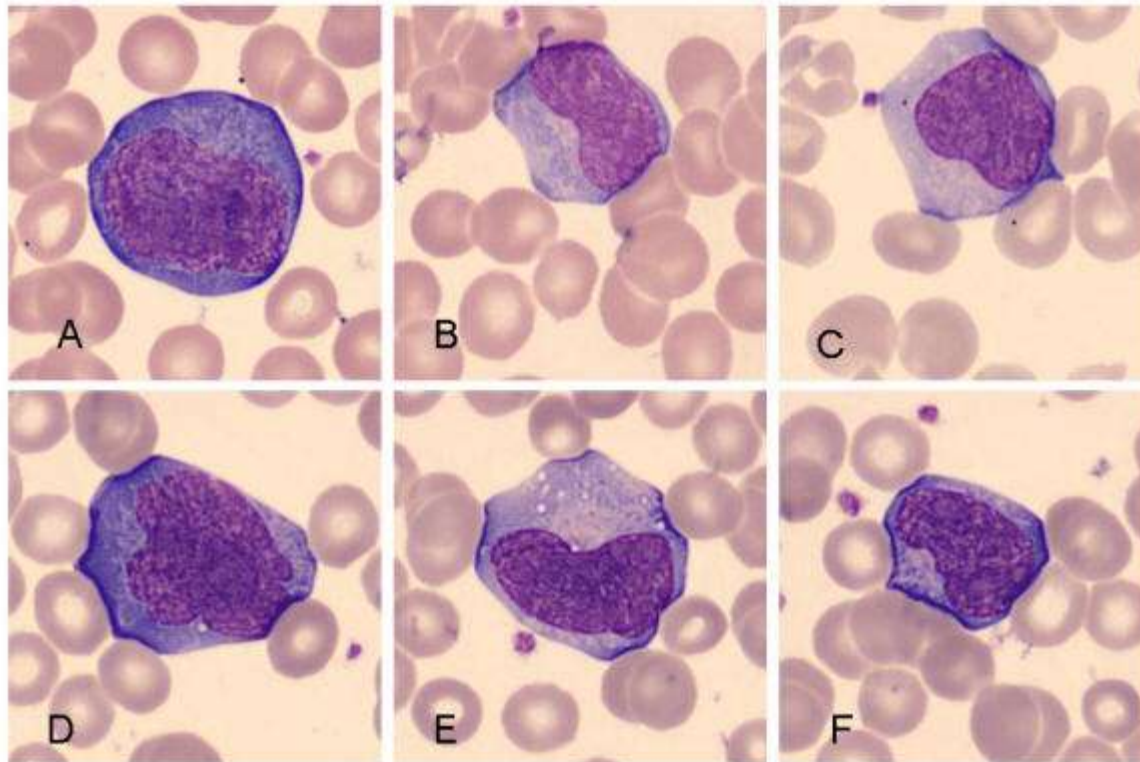
EBV - Bulaş

- EBV'nin enfeksiyöz mononükleozdan sonra aylar sürebilen uzun periyotlarda farengial atılımı bildirilmiştir
- Bağışık kişilerin yaklaşık %15-20'si az miktarda EBV'yi herhangi bir dönemde tükürüklerinde ekskrete etmektedir
- İmmün baskılanmış kişilerde bu oran %50'ye kadar çıkmaktadır



EBV - Tanı

- Atipik lenfositler = CD8+T Lenfositler

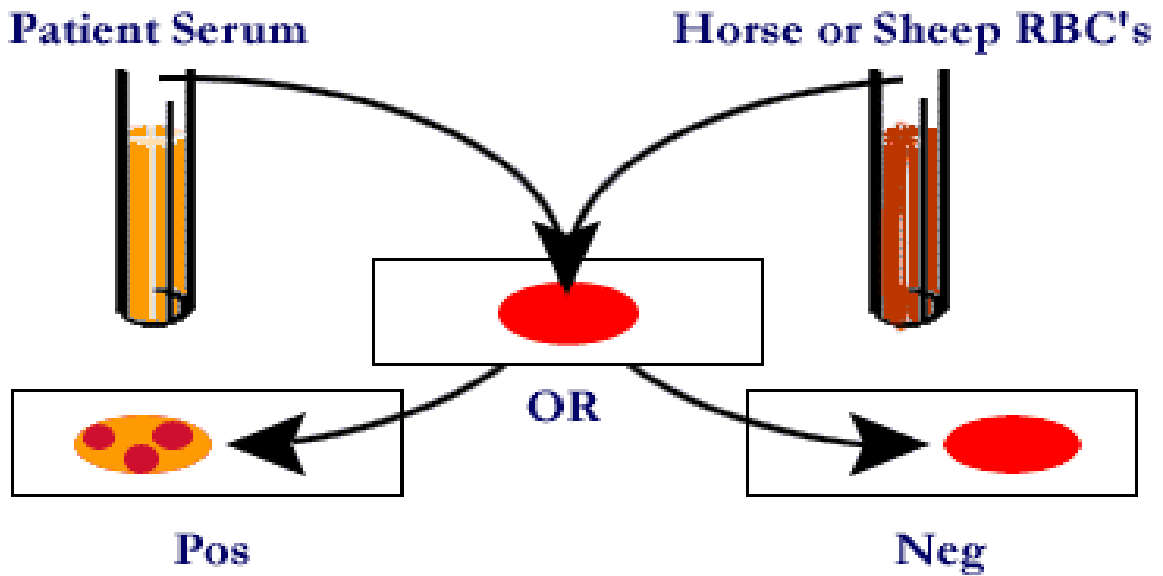
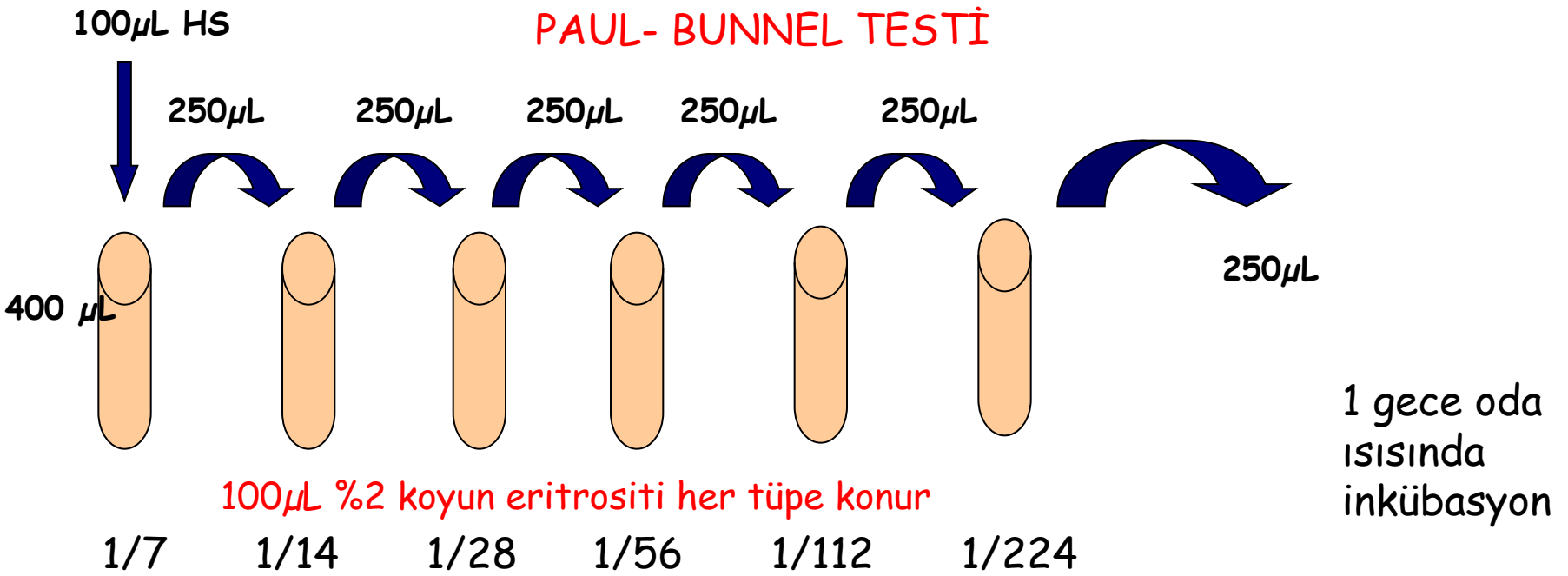


EBV Mikrobiyolojik Tanı

- Heterofil antikorların saptanması
 - Paul-Bunnell Testi, Lam aglütinasyon testi, Mono-Plus testi
- EBV spesifik antikorlar
 - ELISA
 - IFAT
 - İMMÜNBLÖT
- PCR

Paul - Bunnell Testi

- Aralarında filogenetik ilişki olmayan ama yapıları benzeyen antijenlere; Forssman antijeni; Heterofil antijen denir
- Paul-Bunnell → EBV- Koyun eritrositi
- Heterofil antikolar IgM yapısındadır
- IgM hızlı kaybolduğu için Paul-Bunnell testinde aglütinasyon titresi hızlı düşer
1/56 ve üzeri anlamlı "Titre artışı"



Paul - Bunnell testi

- Heterofil antikorlar hastalığın ilk haftasından itibaren serumda bulunabilir ancak 2.-3. haftada pozitif olma olasılığı artar
- Erişkinde %90 ortaya çıkar. 3-6 ay süreyle serumda bulunur sonra kaybolur
- Çocuklarda heterofil antikorlar gösterilemeyebilir, ayrıca düşük titredeki antikor cevabı 1 yıla kadar devam edebilir (Blake et al.,1976)

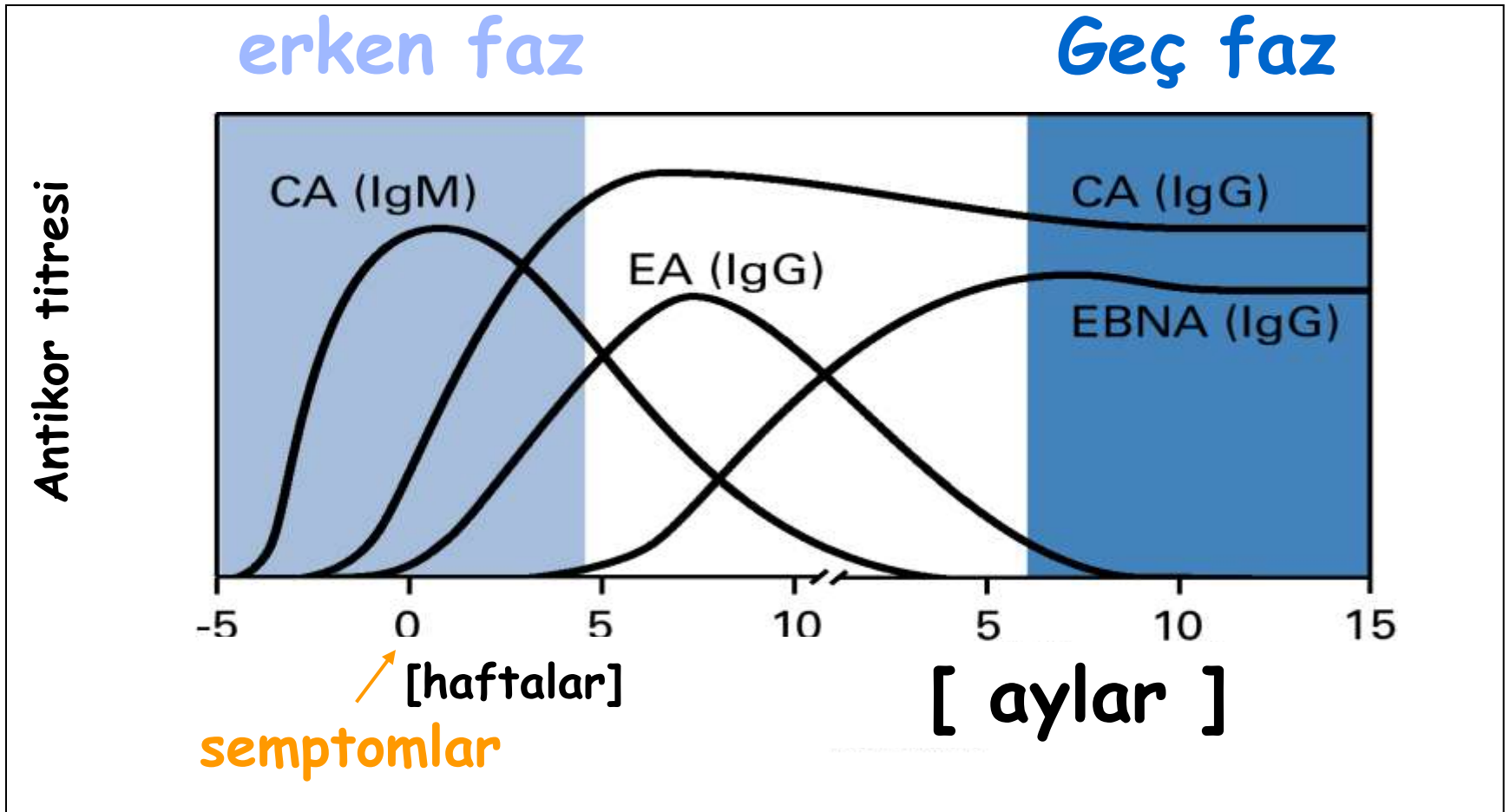
EBV Antijenleri

- Viral Kapsid Antijen (VCA)
- Erken Antijen (EA)
- Epstein-Barr Nükleer Antijen (EBNA)

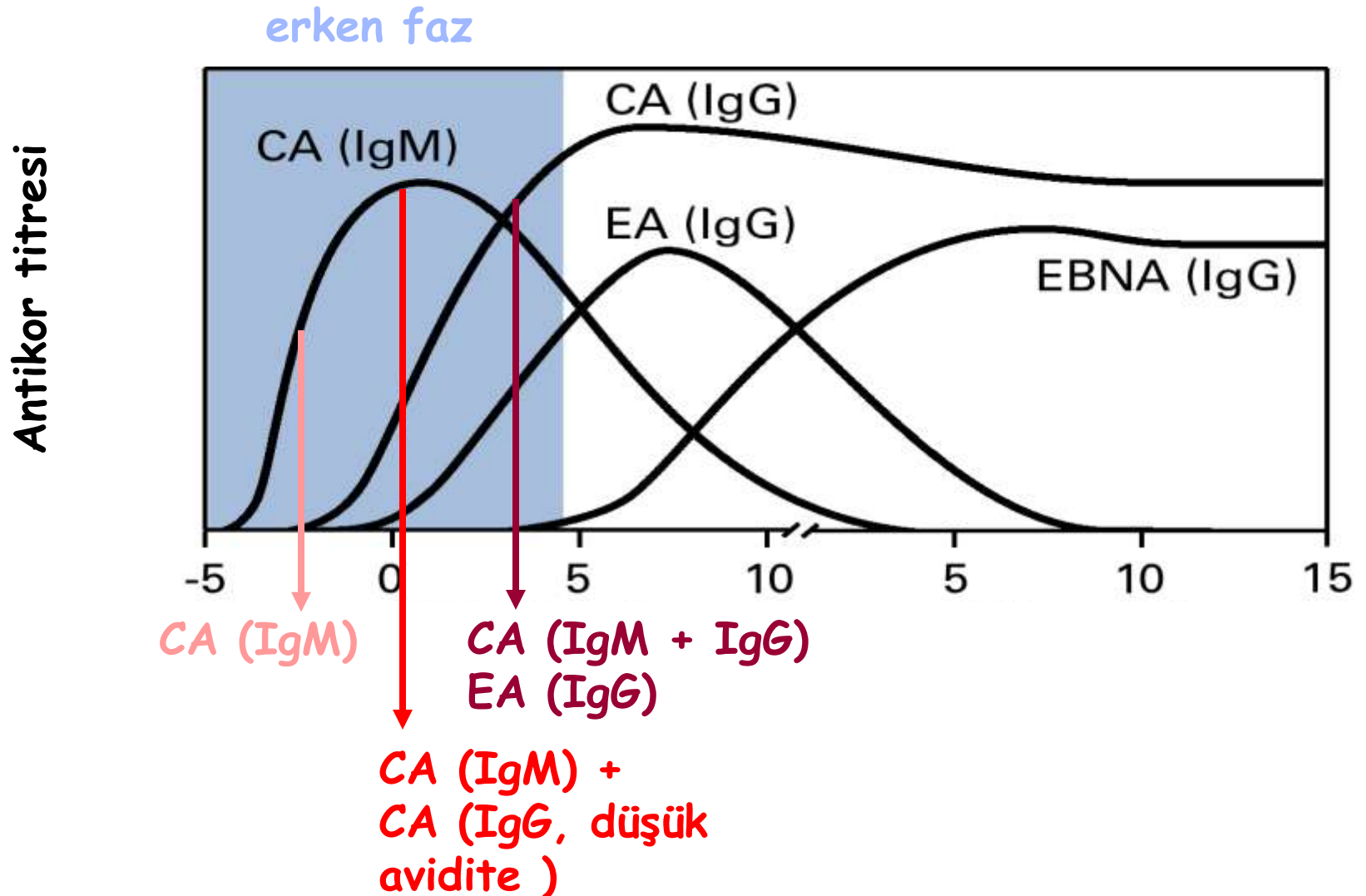
Spesifik antikorlar

- EBV majör antiijenlerine karşı oluşmuş antikorların gösterilmesi akut enfeksiyon, kronik enfeksiyon ve reaktivasyon ayırımında gereklidir
- EBV reaktivasyonunun gösterilmesi özellikle immün baskılanmış kişilerde önemlidir

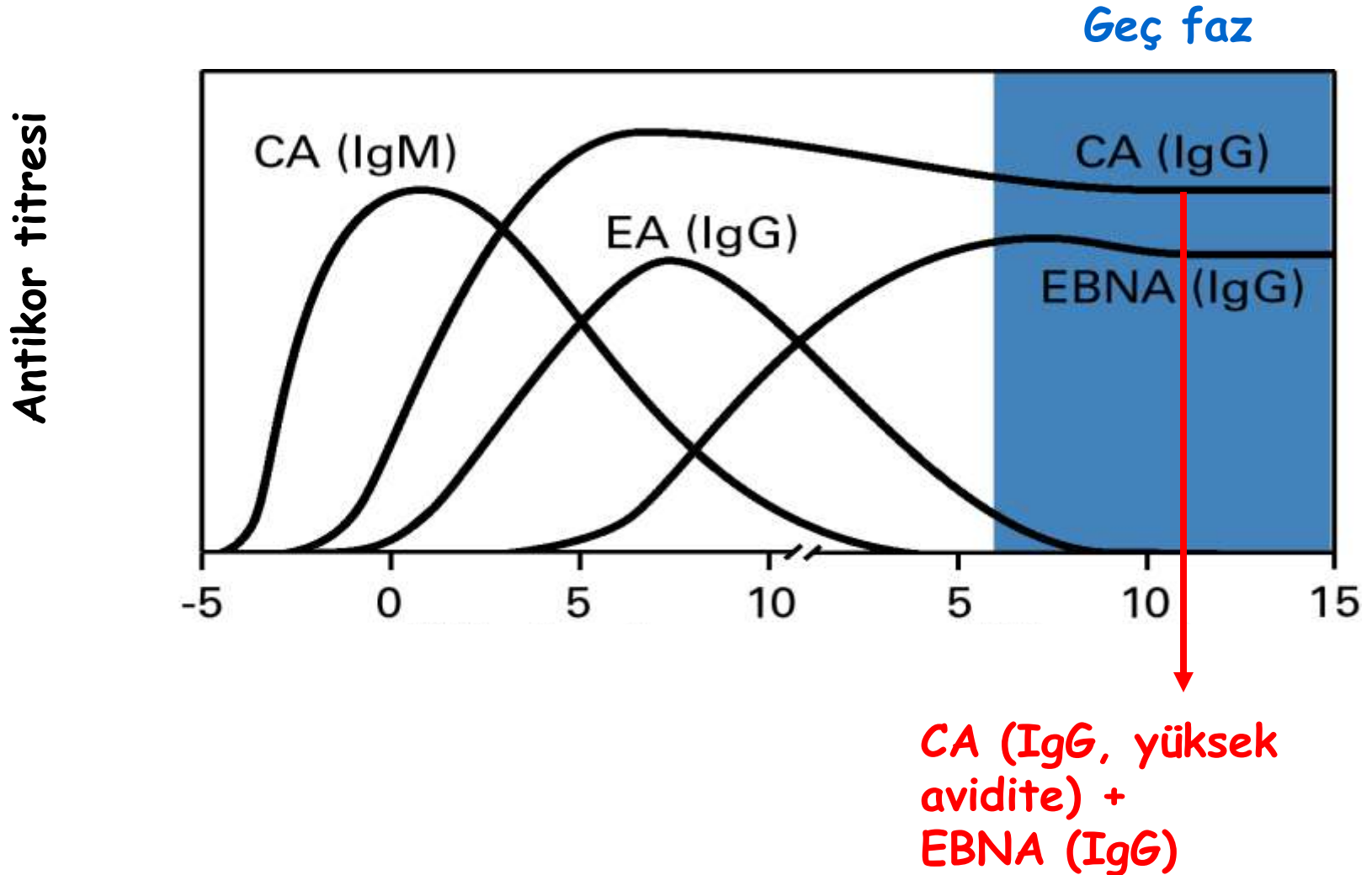
Anti-EBV antikorları; Erken ve Geç faz



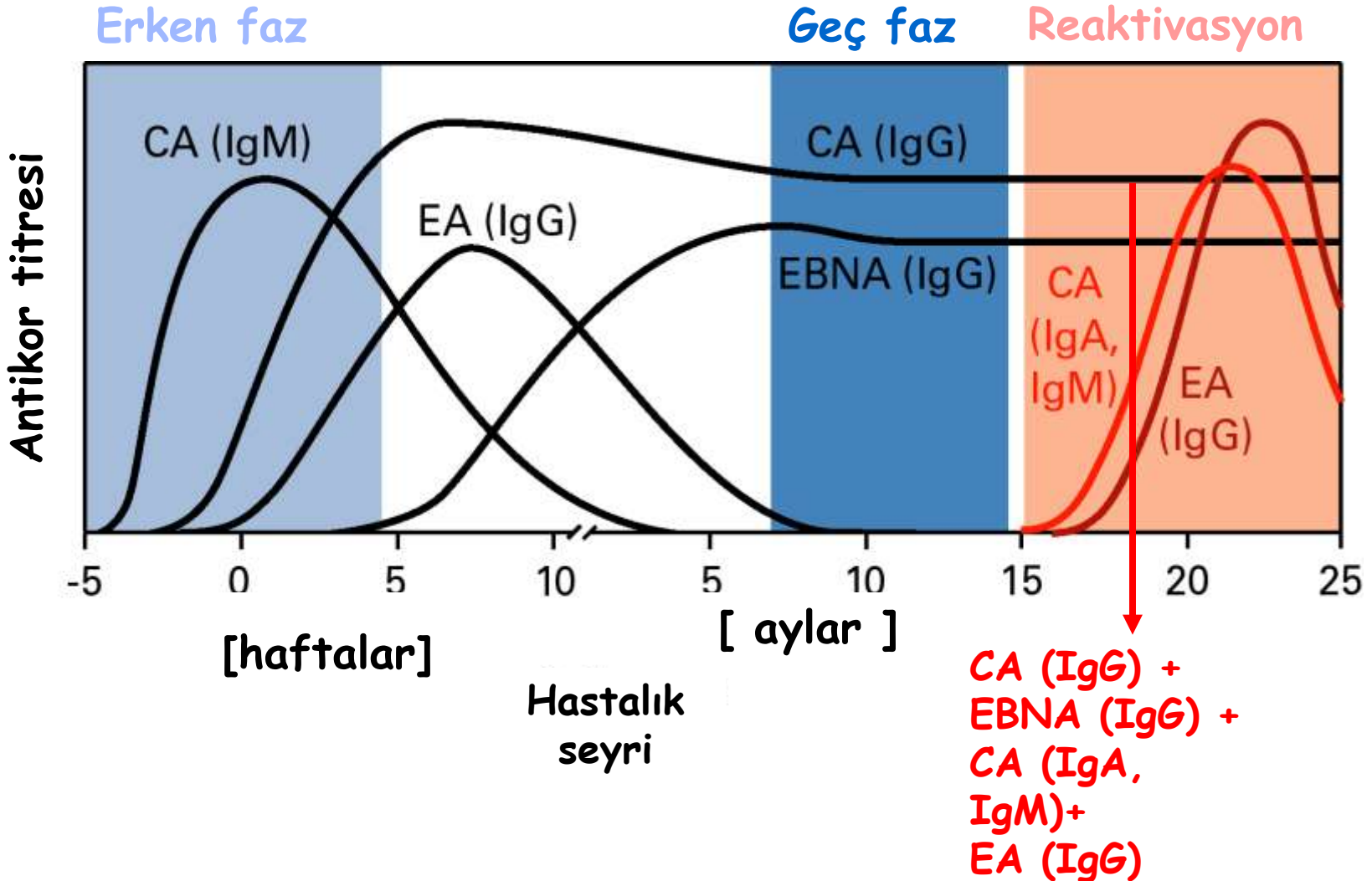
Erken faz



Geç faz



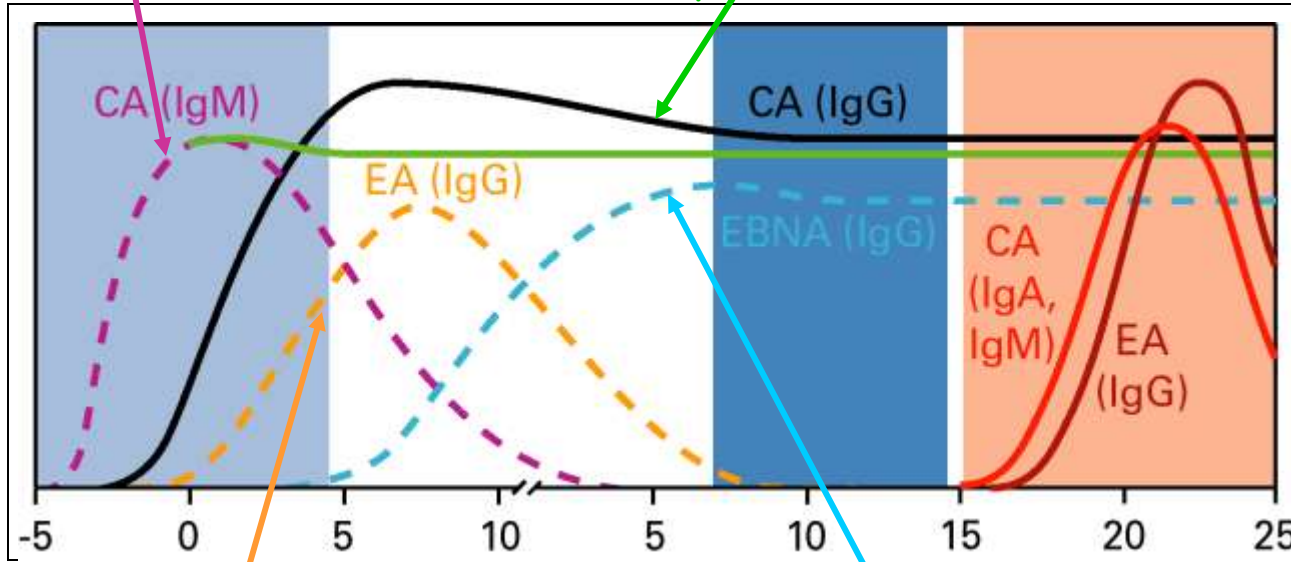
Reaktivasyon



Serolojik Sorunlar

yeni enfeksiyonların %5'inde anti-CA (IgM) bulunmaz

Anti-CA (IgM)
(ender vakalarda)
persistan



yeni enfeksiyonların %20-30'unda Anti-EA (IgG) saptanamaz

Anti-EBNA (IgG) negatif çünkü:

- Kronik aktif EBV enfeksiyonu
- Hücresel immünitinin baskılanması
(⇒ Anti-CA (IgG) + Anti-EA (IgG) ↑↑)

ELISA



- EBV-CA, EBV-EA, EBNA
- Otomatik sisteme uygun
- Kantitatif sonuç
- Avidite testi mümkün
- Değişik kitlerde kullanılan farklı antijen içerikleri nedeni ile testin performansı değişken
 - Hücre ekstratları
 - Rekombinant proteinler
 - Sentetik peptidler

- IFA için saptanan yorumların referans kriterleri, antijen ismi aynı olsa bile tüm ELISA'lar için geçerli olmayabilir
- ÖRNEK: EBNA 1 rekombinant protein

Düşük aviditeli antikolar



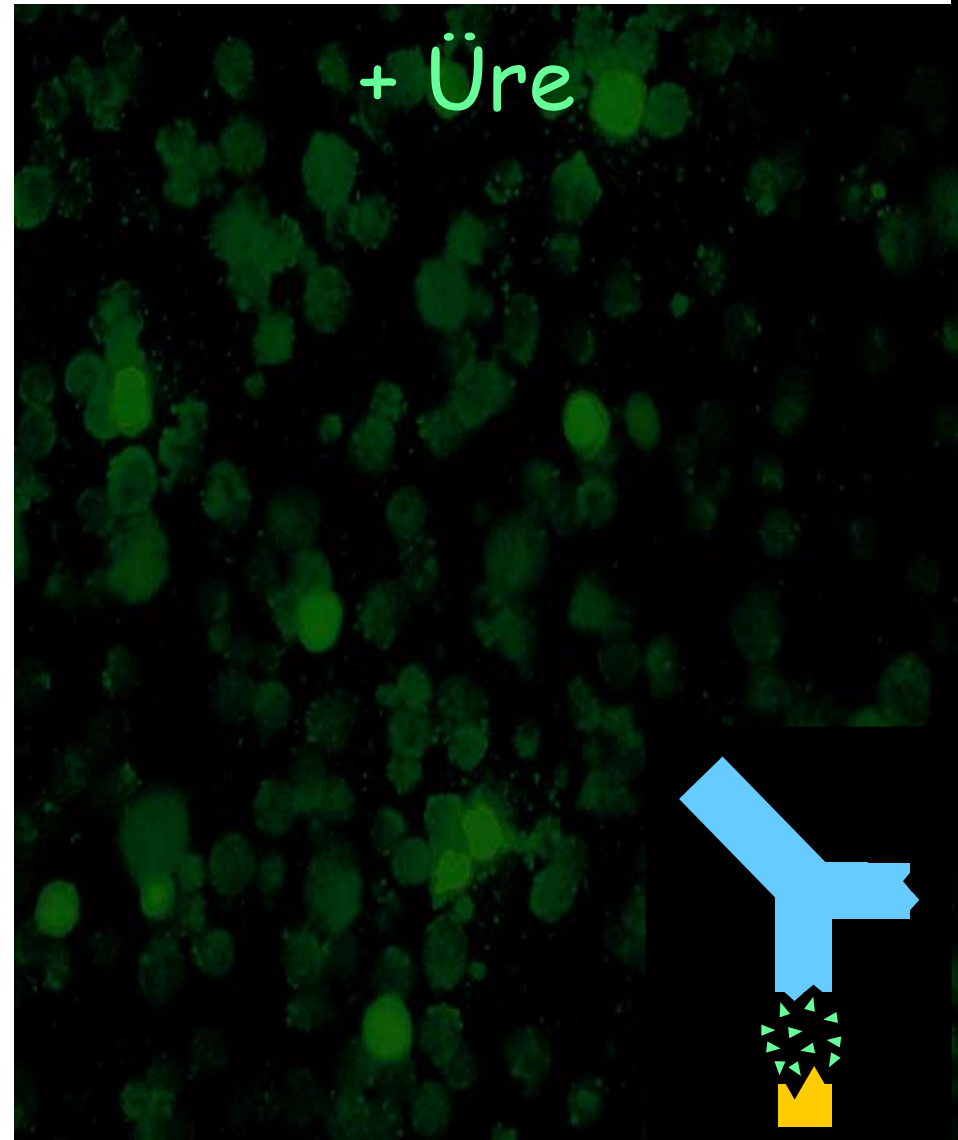
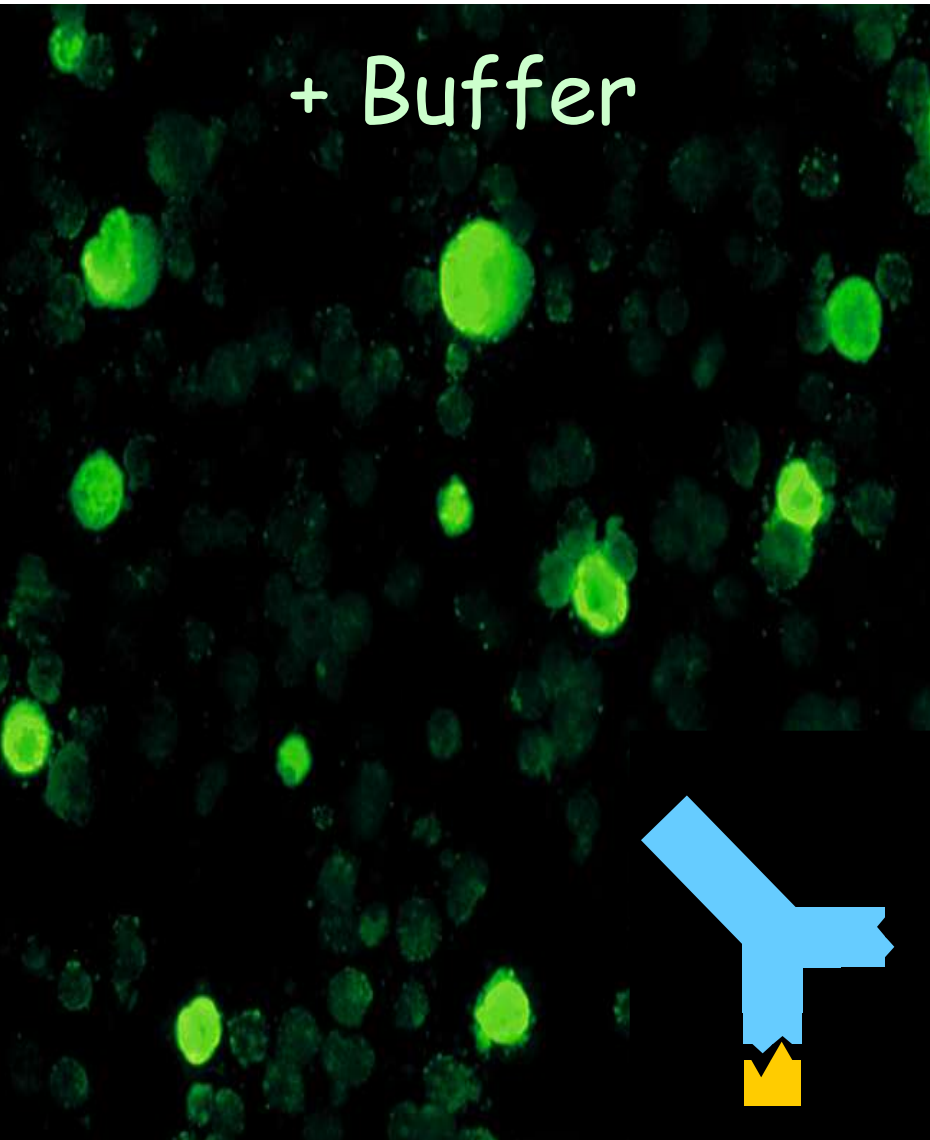
üre

A cluster of green triangles representing antigen fragments is shown being released from the antibody binding site.

Bağlanma
bozular

The blue Y-shaped antibody is shown bound to the yellow epitope. A large number of green triangles (antigen fragments) are being released from the antibody's binding sites, indicating that the binding is weak and unstable.

Düşük aviditeli anti-EBV-CA

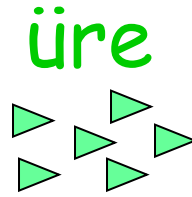


Yüksek aviditeli antikorlar

Yüksek
aviditeli
antikor



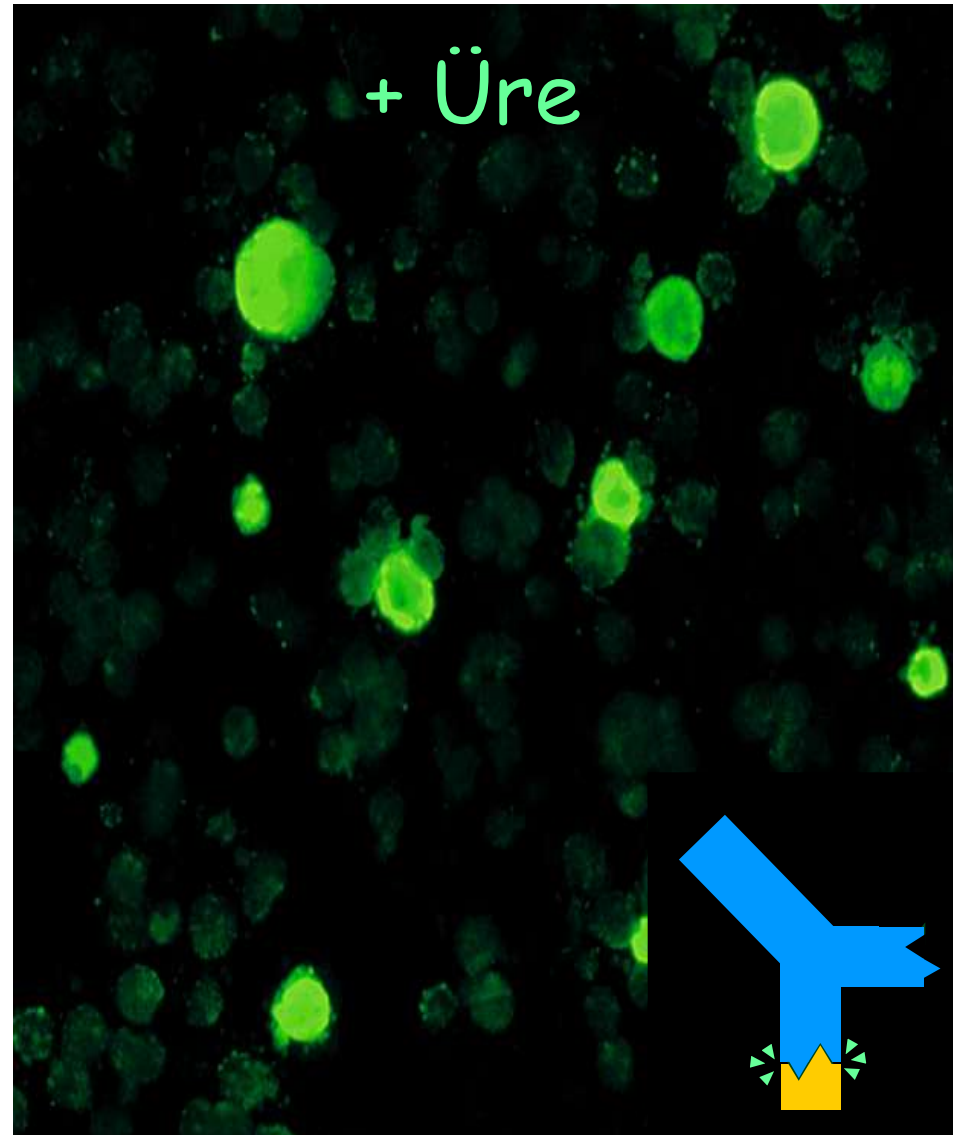
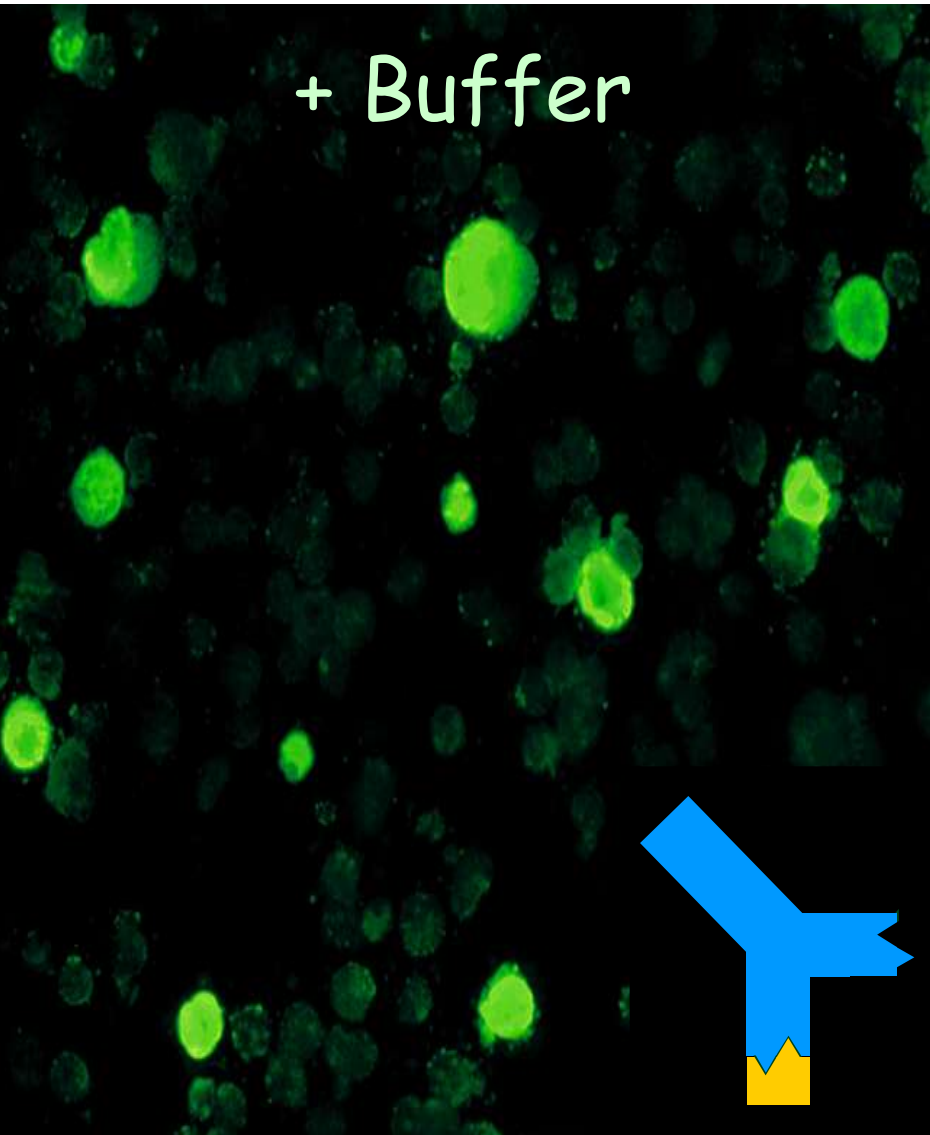
epitop



Bağlanma
stabil kalır



Yüksek aviditeli anti-EBV-CA



IFAT

Seroloji'de altın standart



IMMÜNBLLOT

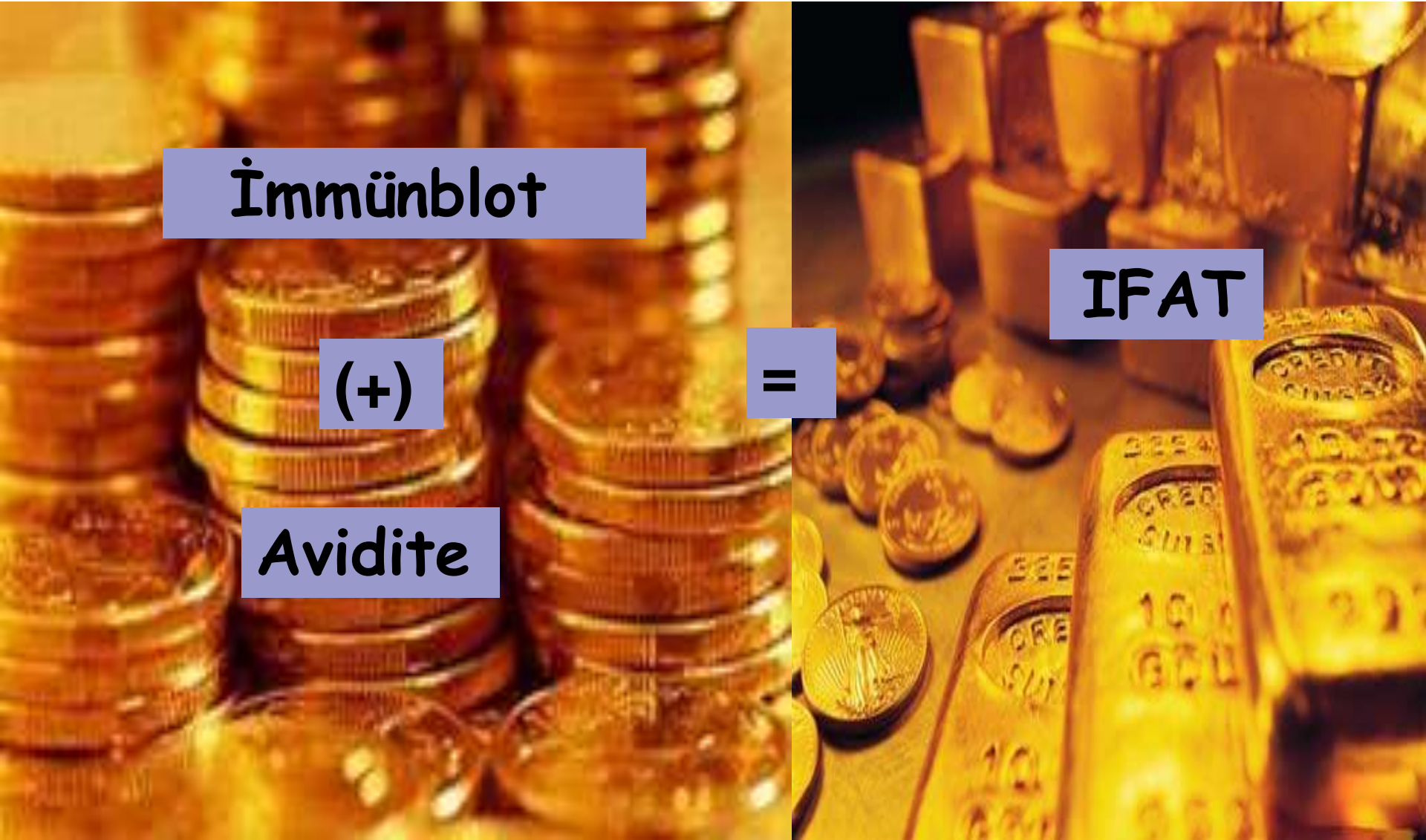
Immünblot

(+)

Avidite

=

IFAT



PCR

- EBV ilişkili hastalıkların tanısı ve takibinde
- EBV enfeksiyonun patogenezi anlamak için
- EBV viral yükünü ölçmek için çok çeşitli yöntem, teknik ve protokol mevcut
- EBV saptanma teknikleri, viral yük değeri sonuçları laboratuvarlar arasında standardizasyon kazanmadı
- Hangi örneğin çalışılacağına dair ortak bir fikir birliği oluşmuş değil

PCR alışmaları

- Primer enfeksiyon tanısı?
- EBV DNA 1-30 yaş arası akut enfeksiyon ve geçirilmiş enfeksiyon serolojisine sahip kişilerde karşılaştırmalı olarak araştırılmış
- EBV DNA akut enfeksiyon - %70
- EBV DNA geçirilmiş enfeksiyon-%4
- Çalışma sonucunda akut EBV tanısı için serolojik testler öncelikli test olmalı
- İmmün baskılanmış kişilerde veya serolojik sonuçları belirsiz kişilerde ikincil tanı yöntemi olması açısından araştırmalar yapılmalı
 - Limitations of PCR testing for diagnosis acute EBV infections. Rosemary C.S.2007. Diagnostic Microbiology and Infectious diseases.

PCR çalışmaları

- 81 serum örneğinde primer enfeksiyon tanısı için EBV DNA sensitivitesi %80, spesifitesi %94, ppv %95, npv %79 bulunmuş
- Antikor avidite testi ile genişletilmiş seroloji altın standart bulunmuş
 - EBV DNA in sera of patients with primary infections.K.H.Chan.2001.Journal of Clinical Microbiology.

PCR alışmaları

- İmmün baskılanmış 1-47 yaş arasında serolojik olarak primer EBV enfeksiyonu olan 98 hastanın serumunda EBV DNA araştırılmış
- EBV DNA sensitivite %94.9, spesifite %97.4, ppv %98.9, npv %88.1 olarak bulunmuş
- EBV spesifik VCA IgG dūřuk avidite varlıęında, EBV DNA daha açık bir klinik iliřki ortaya koymaktadır
 - Serum EBV DNA load in primary EBV infection.Claudia C. B.2005.J.Med.Virol.

PCR alışmaları

- Renal transplant alıcılarının (n=156,58 ocuk) 9 yıllık EBV kan değerleri retrospektif olarak değerlendirilmiş
- EBV PCR pozitifliği çocuklarda erişkinlere göre yüksek oranda saptanmış
- EBV PCR değerleri negatif olan hastalarda PTLD gelişmedi. 3/12 EBV PCR pozitif ocuk hastada PTLD gelişmiş
- Yüksek riskli transplant alıcılarında EBV PCR bakılması özellikle ocuk hastalarda **EBV ilişkili PTLD erken tanısı, önlenmesi açısından** yardımcı olabilir
 - Clinical signifance of peripheral blood EBV viral load monitoring using PCR in renal transplant recipients. Toyoda M.2008.Pediatr Transplantation.

PCR alışmaları

■ Kanser tanı ve takibinde ?

- Nazofarengeal kanser tanısı almış, tedavi görmemiş 114 hastada serum anti-EBV antikorlarına ve plazma EBV DNA düzeylerine bakılmış
- **Kanser nüksü** görülen hastalarda, tedavi öncesinde **belirgin derecede yüksek EBV DNA değerleri** olduğu görölmüş
- Tedavi öncesinde **EBV DNA değerleri yüksek olanlarda**, düşük olanlara göre **4 yıldan fazla yaşam süresi belirgin olarak düşük** saptanmış
- Antikor değerleriyle, nüks ve yaşam süresi arasında ilişki bulunamamış
 - Comparison of the prognostic impact of serum Anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assaya in Nasopharyngeal carcinoma.Chic Wen.2007.Int J.Radiation Oncology.Biol.Phys.

PCR

Table 2. Representative methods to measure Epstein-Barr viral load

Methods	Targets	Characteristics				Disadvantages
		Sensitivity	Rapidity	Handling	Quantitativeness	
Immunofluorescence	Antigen	Low	Moderate	Moderate	Fair	Low sensitivity No good antibodies available
EBER-1 <i>in situ</i> hybridisation	RNA	Moderate	Slow	Difficult	Fair	Only applicable for cells Requires specialised skills
Semi-quantitative PCR	DNA	High	Moderate	Moderate	Poor	Inaccurate quantification
Quantitative-competitive PCR	DNA	High	Moderate	Moderate	Fair	Requires time and labour
Real-time PCR	DNA	High	Rapid	Easy	Fair	Needs special equipment

Tissue

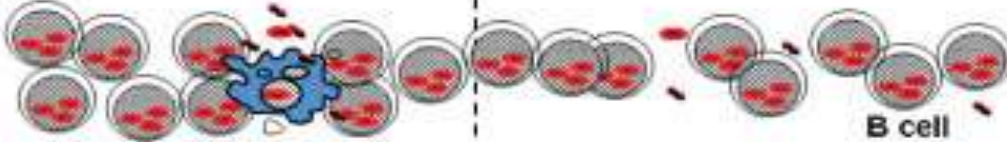
Peripheral Blood

Infectious mononucleosis



Hücre bağımsız + hücre ilişkili EBV DNA

PTLD



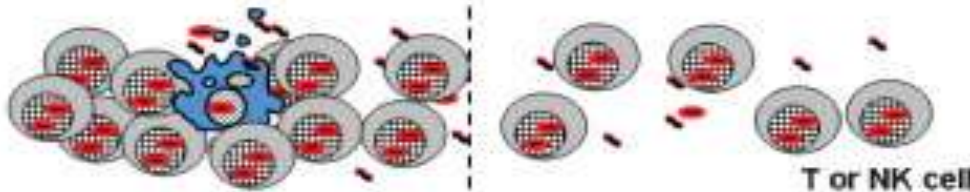
EBV DNA çoğu hücre ilişkili

Hodgkin's lymphoma



Episomal ve çıplak EBV DNA+ Hodgkin hücreleri (latent tümör hücreleri)

Chronic active EBV infection



EBV ile enfekte T ve NK hücreleri+

Hücre bağımsız DNA

Nasopharyngeal carcinoma



Hücre bağımsız DNA

PCR

Table 3. Optimal specimens for measuring viral load in each Epstein-Barr virus (EBV)-associated disease

Disease	Infected cells	Infection pattern	Specimens for measuring viral load		
			Plasma or serum	Mononuclear cells	Whole blood
Infectious mononucleosis	Plasma cells B cells	Lytic infection Latency III	Desirable	Not recommended	Not recommended
Post-transplant lymphoproliferative disorder	B cells	Latency III	Controversial	Desirable	Preferable
Hodgkin's lymphoma	Hodgkin cells (B cell origin)	Latency II	Desirable	Not recommended	ND
Chronic active EBV infection	T or NK cells	Latency II	Useful for prognosis	Desirable for diagnosis	ND
Nasopharyngeal carcinoma	Squamous cells	Latency II (Lytic infection)	Desirable	Not recommended	ND

Çalışma

- Epstein-Barr Virüs Enfeksiyonlarının Tanısında PCR
 - İmmünsüprese Hastalar ve Kontrol grubu
 - U.Ü.T.F'nde takipte olan renal transplant ve çocuk onkoloji hastaları
 - U.Ü.T.F'ne başvuran immünsüprese tedavi almayan hastalar
 - İmmünsüprese hasta grubuna dahil olan hastalardan periyodik kan alındı
 - Kontrol hasta grubu, ELISA/Seroloji laboratuvarlarımıza tetkik amaçlı gönderilen hasta sonuçları doğrultusunda seçildi

KONTROL GRUBU HASTALARININ SONUÇLARI

	Ön Tanı/ Tanı	Yaş	Periferik Yayma	P.B.	İmmünblot	PCR
A.C	E.M / Lenfoma?	Çocuk	%66 Lenfosit	1/28 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (+) VCA IgM (+) EA IgG (+)	7723 kopya/mL
E.P.	Viral enfeksiyon	Çocuk	%66 Lenfosit (%20-25 iri lenfosit, %2-3 atipik lenfosit)	1/448 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (-) VCA IgM (+) EA IgG (+)	242 kopya/mL
D.U	Akut lenfadenit	Çocuk	%70 lenfomonositoz (%50 iri lenfosit, downey hücrelerine benzer hücreler)	1/56 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (-) VCA IgM (+) EA IgG (+)	1.109 kopya/mL

KONTROL GRUBU HASTALARININ SONUÇLARI

	Ön Tanı/ Tanı	Yaş	Periferik Yayma	P.B.	İmmünblot	PCR
M.F.B	Enfeksiyöz Mononükleoz	Çocuk	%65 Lenfosit (%15 iri bazofilik sitoplazmalı)	1/14 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (-) VCA IgM (+) EA IgG (+)	1.427 kopya/mL
K.C	Lenfadenit	Çocuk		1/14 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (-) VCA IgM (+) EA IgG (+)	719 kopya/mL
E.Y	Viral Enfeksiyon	Erişkin	%70 Lenfosit	1/448 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (-) VCA IgM (+) EA IgG (+)	340 kopya/mL

İMMÜNSÜPRESİF HASTA GRUBUNUN SONUÇLARI

	Ön Tanı/ Tanı	Yaş	Zaman	P.B.	İmmünblot	PCR
Y.E	Renal TX	Erişkin	Transplant sonrası 3.ay	1/14 (+)	VCA IgG (+) EBNA IgG (+) VCA IgM (-) EA IgG (-)	3273 kopya/mL
M.Ç	Çocuk Onkoloji (Eozinofilik granüloma)	Çocuk	Tedavi sonrası 3.ay	Negatif	VCA IgG (+) EBNA IgG (+) VCA IgM (+) EA IgG (-)	840 kopya/mL
A.A	Çocuk Onkoloji (Hodgkin Lenfoma)	Çocuk	Tedavi öncesi	Negatif	VCA IgG (+) EBNA IgG (+) VCA IgM (-) EA IgG (+)	3701 kopya/mL



*TEŞEKKÜR
EDERİM...*