

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Současné možnosti laboratorní diagnostiky EBV

Bc. Denisa Janů

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Barbora Kletenská

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, ochotu, vstřícnost, pečlivost a čas, který tomu věnoval. Také bych chtěla poděkovat MUDr. Barboře Kletenské, MUDr. Kateřině Mlčochové a MUDr. Janě Cihlářové za odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegyním a kolegovi z laboratoře Vidia diagnostika za podporu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 31. 8. 2023

OBSAH

1.	ABSTRAKT	6
2.	ABSTRACT	8
3.	ÚVOD	10
4.	CÍL PRÁCE.....	11
5.	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
5.1	Virus Epstein-Barr.....	12
5.1.1	Historie	12
5.1.2	Taxonomie.....	12
5.1.3	Epidemiologie.....	13
5.1.4	Stavba viru.....	15
5.1.5	Životní cyklus viru.....	16
5.2	Onemocnění asociovaná s EBV	18
5.2.1	Infekční mononukleóza	18
5.2.2	Burkittův lymfom	21
5.2.3	Hodgkinův lymfom	23
5.2.4	Další lymfoproliferativní onemocnění spojovaná s EBV	24
5.2.5	Nasofaryngeální karcinom	25
5.3	Léčba a profylaxe	26
5.4	Laboratorní diagnostika EBV	28
5.4.1	Heterofilní protilátky.....	28
5.4.2	Virově specifické protilátky.....	29
5.4.3	Přímý průkaz.....	31
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
6.1	Vyšetřovaný materiál	33
6.2	Průkaz heterofilních protilátek IM testem.....	33
6.3	Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)	36
6.4	Nepřímá imunofluorescence (NIF).....	39
6.5	Avidita protilátek.....	45
6.6	Microblot array (MBA)	47
6.7	Detekce EBV DNA pomocí real-time PCR.....	51

6.8	Klinická interpretace	56
7.	VÝSLEDKY	58
7.1	IM test	58
7.2	CLIA.....	60
7.3	NIF	63
7.4	Avidita	64
7.5	MBA.....	66
7.6	PCR	67
7.7	Klinická interpretace	68
7.7.1	Incidence primoinfekce v letech 2019-2022.....	71
7.7.2	Séroprevalence testovaného souboru pacientů.....	74
8.	DISKUSE	77
9.	ZÁVĚR.....	80
10.	POUŽITÉ ZKRATKY	81
11.	SEZNAM TABULEK.....	83
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	85
13.	SEZNAM GRAFŮ	87
14.	POUŽITÁ LITERATURA	88

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor práce: Bc. Denisa Janů

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Název diplomové práce: Současné možnosti laboratorní diagnostiky EBV

Cíl: Cílem této práce je seznámení s problematikou infekce virem Epstein-Barrové (EBV) a jeho laboratorní diagnostikou. Dalším cílem je rozdělení pacientů do skupin podle sérologického obrazu, následné zhodnocení promořenosti EBV a zhodnocení incidence primární infekce EBV v testovaném souboru pacientů za roky 2019-2022.

Metody: Ke stanovení specifických protilátek proti EBV byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza a nepřímá imunofluorescence. Vyšetření bylo v některých případech doplněno stanovením avidity protilátek anti-VCA IgG a metodou microblot array. K detekci EBV DNA byla použita real-time PCR. Zpracování výsledků a tvorba tabulek a grafů proběhla v programu Microsoft Excel 2016.

Výsledky: Za roky 2019-2022 bylo v laboratoři infekční sérologie a virologie společnosti Vidia-Diagnostika otestováno 14 736 pacientů na přítomnost specifických protilátek proti EBV, 263 pacientů na přítomnost heterofilních protilátek a 42 pacientů na přítomnost EBV DNA. Nejvíce pozitivních nálezů heterofilních protilátek bylo podle očekávání zachyceno u pacientů ve věku 10-20 let. Věkové rozmezí pozitivních pacientů bylo od 3 do 31 let s nejvyšším počtem pozitivních ve věku 15 a 19 let. Věkové rozmezí pacientů s obrazem primární infekce EBV bylo 1-44 let. Nejvíce primoinfekcí v testovaném souboru pacientů bylo podle očekávání zachyceno u pacientů ve věku 15-19 let. Promořenost testovaného souboru, který tato práce zahrnovala, byla 86,7 %. Většinu nepromořené populace testovaného souboru tvořili pacienti do 20 let (11,5 %). Promořenost nad 20 let věku pacienta činila 98,2 %.

Závěry: Šíření EBV v populaci je obrazem kulturních zvyků a socioekonomického statusu. Z dostupných dat vyplývá, že se zvyšuje věk při onemocnění primární infekcí EBV. Tento jev s sebou nese riziko většího počtu těžších průběhů onemocnění s potřebou hospitalizace. Primární infekce EBV byla detekována nejčastěji u pacientů ve věku 15-19 let, kdy dochází k prvním intenzivním mezilidským kontaktům. Promořenost testovaného vzorku pacientů nad 20 let je více než 98 %. Tyto závěry korelují s daty v zahraničních odborných studiích.

Klíčová slova: EBV, infekční mononukleóza, Burkittův lymfom, Hodgkinův lymfom, avidita, CLIA, PCR, Western blot

2. ABSTRACT

Charles university

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study programme: Bioanalytical laboratory diagnostics in health care

Author: Bc. Denisa Janů

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Current possibilities of laboratory diagnostics of EBV

Background: The aim of this diploma thesis was to get acquainted with the issue of Epstein-Barr virus infection and its laboratory diagnostics. Other aim was to divide the patients into groups according to the serological results, then evaluate the prevalence of EBV and evaluate the incidence of primary EBV infection in the tested group of patients for the years 2019-2022.

Methods: Chemiluminescence immunoassay and indirect immunofluorescence were used to determine specific antibodies against EBV. In some cases, the examination was completed by determining the avidity of anti-VCA IgG antibodies and the microblot array method. Real-time PCR was used to detect EBV DNA. Microsoft Excel 2016 was used to process data and to create tables and graphs.

Results: For the years 2019-2022, 14,736 patients were tested for the presence of specific antibodies against EBV in the infectious serology and virology laboratory of Vidia-Diagnostika, 263 patients for the presence of heterophile antibodies and 42 patients for the presence of EBV DNA. As expected, most positive findings of heterophile antibodies were detected in patients aged between 10 and 20 years. The age range of positive patients was from 3 to 31 years, with the highest number of positive patients at the age of 15 and 19. The age range of patients with primary EBV infection was 1-44 years. The highest number of primary infections in the tested group of patients was, as expected, in patients aged between 15 and 19 years. The seroprevalence of the tested population included in this work was 86.7 %. Patients

under 20 years of age (11.5 %) made up the majority of the seronegative population of the tested group. The seroprevalence of patients over 20 years of age was 98.2 %.

Conclusions: The prevalence of EBV in the population is a reflection of cultural habits and socioeconomic status. Available data show that the age at onset of primary EBV infection is increasing. This phenomenon entails the risk of a greater number of more severe disease courses requiring hospitalization. Primary EBV infection was detected most often in patients aged between 15 and 19 years, when the first intensive interpersonal contacts occur. The prevalence of the tested sample of patients over 20 years old is more than 98 %. These conclusions correlate with data in foreign professional studies.

Keywords: EBV, Infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, avidity, CLIA, PCR, Western blot

3. ÚVOD

Virus Epstein-Barrové (EBV) je lidský herpetický DNA virus, který se vyskytuje u více než 90 % populace a dokáže doživotně přetrvávat v hostiteli (člověku). Tato úspěšná celoživotní perzistence a schopnost vyvolat latentní infekci buněk navzdory specifickým imunitním odpovědím ukazuje, že si EBV vyvinul výkonné strategie a mechanismy pro využití, vyhnutí se, narušení nebo snížení imunitních reakcí tak, aby si zajistil vlastní přežití. (Lünemann *et al.*, 2015)

Je původcem zejména infekční mononukleózy, která je mezi laickou veřejností známá jako „nemoc z líbání“. Také je spojován s výskytem některých malignit lymfatických tkání (Burkittův, Hodgkinův a další lymfomy), nasofaryngeálního karcinomu a chronického únavového syndromu. U imunokompromitovaných jedinců, např. HIV pozitivních, kromě výše zmíněných lymfomů způsobuje vlasatou leukoplakii jazyka. (Smíšková, 2012)

Laboratorní diagnostika EBV se opírá většinou o průkaz nespecifických heterofilních protilátek a specifických protilátek proti antigenům viru. Vyšetřují se protilátky proti časnému antigenu, kapsidovému antigenu a nukleárnímu antigenu. Zlatým standardem sérologické diagnostiky EBV je detekce protilátek pomocí imunofluorescence. Vzhledem k časové a finanční náročnosti tohoto vyšetření většina laboratoří využívá plně automatizované chemiluminiscenční analyzátory s vyšší kapacitou testovaných vzorků za hodinu.

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je seznámení s problematikou infekce virem Epstein-Barrové (EBV) a jeho laboratorní diagnostikou. Dalším cílem je rozdělení pacientů do skupin podle sérologického obrazu, následné zhodnocení promořenosti EBV a zhodnocení incidence primární infekce EBV v testovaném souboru pacientů za roky 2019-2022.

V teoretické části je popsán virus EBV, jeho historie, taxonomie, epidemiologie, stavba a životní cyklus. Dále se věnuje onemocněním, která EBV způsobuje, nebo jsou s EBV asociována, shrnuje možnosti léčby a profylaxe. Na závěr je uveden popis metod, které se využívají zejména v rutinní laboratorní diagnostice EBV.

Experimentální část je zaměřena na detekci specifických protilátek proti viru Epsteina-Barrové pomocí chemiluminiscenční imunoanalýzy a nepřímé imunofluorescence, případně i stanovení avidity IgG protilátek, potvrzení protilátek metodou western blot a přímého průkazu EBV DNA metodou PCR, u souboru pacientů z laboratoře infekční sérologie a virologie společnosti Vidia diagnostika spol. s r.o. za roky 2019 až 2022 a rozdělení pacientů do skupin podle sérologického obrazu.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Virus Epstein-Barr

5.1.1 Historie

Výzkum viru započal profesor Anthony Epstein po vyslechnutí přednášky doktora Denise Burkitta v roce 1961 o maligním lymfomu postihujícím děti v Africe, později známém jako Burkittův lymfom, během které ho napadlo, že by tento lymfom mohl být způsobený virem. Ihned po přednášce se profesor Epstein domluvil s doktorem Burkitem na spolupráci. O pár týdnů později Epstein navštívil Ugandu, aby zajistil podmínky pro převoz vzorků lymfomů od Burkittových pacientů do své laboratoře v Londýně. Po dvouletém neúspěšném výzkumu profesor zaměstnal doktora Berta Achonga, aby se ujal práce s elektronovým mikroskopem, a postgraduální studentku Yvonne Barrovou, aby mu pomohla s kultivací buněk. Ke konci roku 1963 došlo ke zpoždění letadla s dalšími vzorky lymfomu. Vzorek se zdál být kontaminovaný bakteriemi. Epstein však zjistil, že kalnost média není způsobená bakteriemi, ale jedná se o volně plavající buňky. V únoru roku 1964 byl virus poprvé zachycen v elektronovém mikroskopu a identifikován jako jeden z herpesvirů. (Epstein *et al.*, 1964; Epstein, 2012) O čtyři roky později byly publikovány studie o souvislosti infekční mononukleózy a nového viru izolovaného z Burkittova lymfomu. (Henle *et al.*, 1968)

5.1.2 Taxonomie

Virus patří do čeledi *Herpesviridae*, tzv. herpetické viry. *Herpesviridae* jsou DNA viry, které se vyznačují zejména schopností navození celoživotní latentní infekce v nakažených hostitelských buňkách a schopností reaktivace infekce. (Roubalová, 2008)

Rodina *Herpesviridae* se dělí na *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* a *Gammaherpesvirinae*. Podčeleď *Alphaherpesvirinae* zahrnuje rody *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus* a *Varicellovirus*. Podrodina *Betaherpesvirinae* rody *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus*, *Quwivirus*, *Roseolovirus*.

A podrodina *Gammaherpesvirinae* rody *Bosavirus*, *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Manticavirus*, *Patagivirus*, *Percavirus* a *Rhadinovirus*. EBV, neboli lidský gammaherpesvirus 4, je taxonomicky zařazen do podrodiny *Gammaherpesvirinae*, rodu *Lymphocryptovirus*. (Gatherer *et al.*, 2021)

Herpetické viry mají široké spektrum hostitelů od plazů přes ptáky až po savce. Nejvýznamnějších pro člověka je celkem 8 herpesvirů, a to virus oparu (*herpes simplex* typu 1 *labialis*, *herpes simplex* typu 2 *genitalis*), virus planých neštovic (*herpes hominis* 3 *varicellovirus*), virus Epstein-Barrův (*herpes hominis* 4 *lymphocryptovirus*), lidský cytomegalovirus (*herpes hominis* 5 *cytomegalovirus*), virus exanthema subitum (*herpes hominis* 6 *roseolovirus*), lidský herpesvirus 7 (*herpes hominis* 7 *roseolovirus*) a lidský herpesvirus 8 (*herpes hominis* 8 *rhadinovirus*). (Votava *et al.*, 2003)

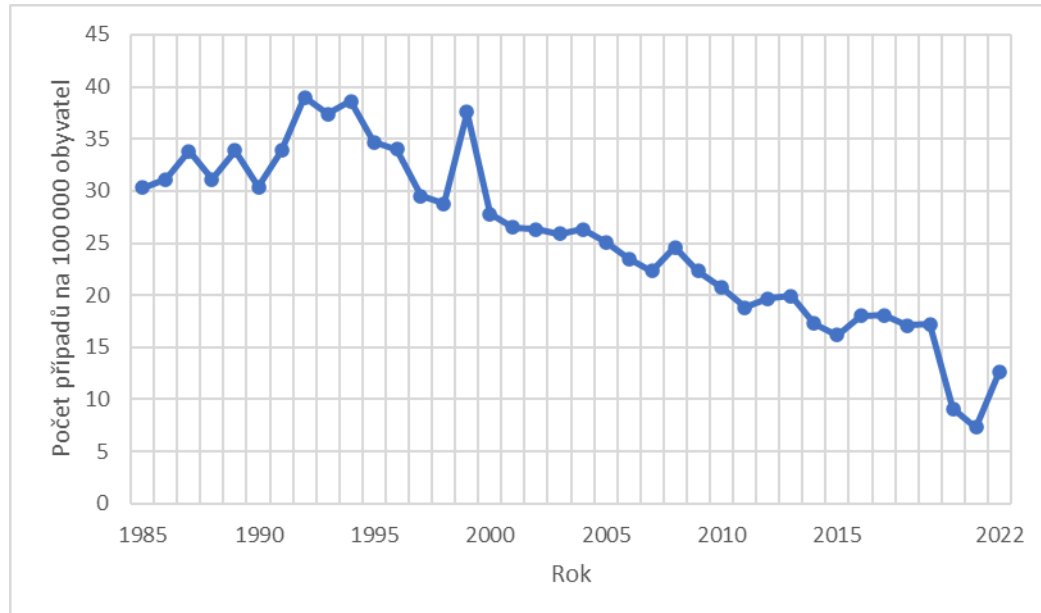
Existují dva hlavní genotypy EBV, typ 1 a typ 2. Tyto dva typy se liší v genu EBNA-2, který vykazuje pouze 54% homologii. (Smatti *et al.*, 2018) Liší se i geografickou distribucí. Pro většinu populace je typický EBV-1. EBV-2 se vyskytuje zejména v Nové Guinei a rovníkové Africe, ale se stejnou prevalencí jako EBV-1. (Thompson and Kurzrock, 2004)

5.1.3 Epidemiologie

EBV se přenáší zejména slinami, většinou už v raném věku. Přenáší se ale i transplantací orgánů, krví a dalšími tělními tekutinami. (Alfieri *et al.*, 1996; Trottier *et al.*, 2012) V minulém století EBV séropozitivita u dětí v Asii dosahovala 90 % a více (už ve věku 5-9 let), kdežto v západních zemích byla průměrně 50 % (26-38 % 17-18letých v USA v roce 1970, 45 % 5-9letých v Anglii v letech 1995-96, 65 % 5-9letých ve Francii v roce 1975, 38 % 7-8letých v Austrálii v letech 1969-72) s výjimkou severní Itálie (80 % 5-7letých v roce 1993), Mexika (93,5 % 5-9letých v roce 1968) a afrických zemí. (Hinuma *et al.*, 1969; Ito *et al.*, 1970; Niederman *et al.*, 1970; Golubjatnikov *et al.*, 1973; de-Thé *et al.*, 1975; Lai *et al.*, 1975; Leogrande and Jirillo, 1993; Kangro *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 1989) To ukazuje na významný vliv socioekonomických faktorů a kulturních zvyků na přenos EBV. Podle novějších studií podíl séropozitivních dětí ve věku 6-8 let v USA do roku 2009-2010 dosáhl 50 % a ve věku 18-19 let až 89 %. (Balfour *et al.*, 2013) Jiná studie ukazuje velké rozdíly

v prevalenci EBV mezi černošskými, bělošskými a hispánskými dětmi ve věku 6-19 let v letech 2003-2010, a to 83 %, 57 % a 85 %. (Dowd *et al.*, 2013) Japonsko prošlo od 80. let velkým ekonomickým rozvojem a séroprevalence u dětí ve věku 5-6 let se ze 100 % v roce 1968 snížila na 59 % v letech 1995-1999 a na dokonce méně než 50 % do roku 2006. (Hinuma *et al.*, 1969; Takeuchi *et al.*, 2006) I ve Francii zaznamenali snižující se procento séropozitivních dětí. Zaznamenali také zvýšení průměrného věku pacientů s primární infekcí EBV z 13 let v letech 2000-2007 na 15 let v letech 2008-2016. V rámci této studie pozorovali signifikantní zvýšení séronegativních pacientů, které tvořilo 2,1 % za roky 2001-2005, 2,5 % za roky 2006-2010, a 3,1 % za roky 2011-2015 ($p < 0,01$). (Fourcade *et al.*, 2017)

Zdá se, že výskyt infekční mononukleózy (IM) v ČR vykazuje dlouhodobě klesající trend (Graf 1). Počet hlášených případů infekční mononukleózy v ČR se od roku 1985 snížil z 30,3 případů na 19,9 případů na 100 000 obyvatel. Nejvíce hlášených případů IM v roce 2013 bylo u pacientů ve věku 15-19 let. Největší výskyt byl v jihomoravském a moravskoslezském kraji. (ÚZIS ČR, 2013)



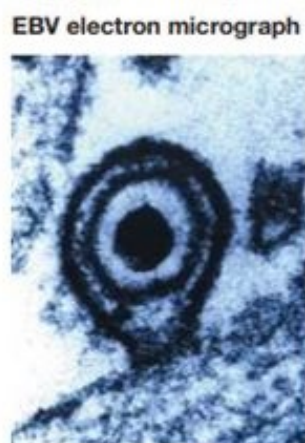
Graf 1: Vývoj incidence infekční mononukleózy v ČR v letech 1985-2022

Zdroj: ÚZIS, 2013, 2023

5.1.4 Stavba viru

Virová částice EBV se podstatně neliší od virových částic ostatních herpesvirů. Je velká 120-200 nm, ikosahedráního tvaru s typickou architekturou (Obr. 1) Virion se skládá z obalu, tegumentu, kapsidy se 162 kapsomerami a nukleoidu s dvouvláknovou lineární DNA, která se v infikované buňce mění na cirkulární. (Votava *et al.*, 2003)

DNA EBV kóduje přes 85 genů, které jsou rozděleny na latentní a lytické, a ty jsou dále rozděleny na bezprostřední časné, opožděné časné a pozdní geny. Latentní geny kódují regulační proteiny, které transaktivují buněčné geny, ovlivňují buněčný cyklus, inhibují diferenciaci a apoptózu a blokují expresi lytických genů. Během latence jsou produkovány nukleární antigeny EBNA1-6, latentní membránové proteiny LMP1-2 a malé nekódující vysoce strukturované RNA zvané EBERs1-2 (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs). (Roubalová, 2008; IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012)



Obr. 1: Virová částice EBV v elektronovém mikroskopu

Obrázek zachycuje zralou virovou částici EBV přichytávající se na buňce. Virová částice se skládá z obalu, uvnitř se nachází silně zbarvený nukleoid chráněný kapsidou. Zvětšení 284000x.

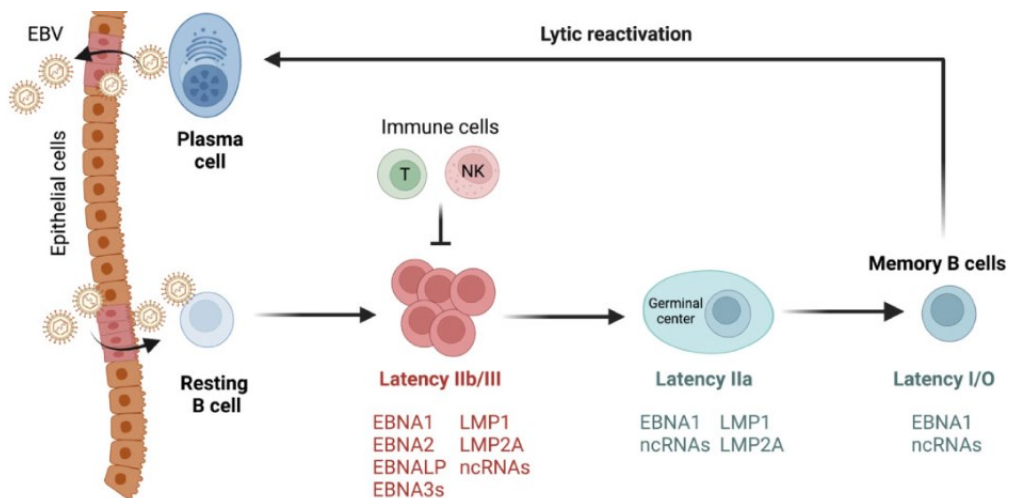
Zdroj: Young and Rickinson, 2004

Bezprostředně časné lytické proteiny fungují jako transaktivátory, zahajují replikaci, interagují s transkripčním aparátem, transportéry proteinů a RNA z jádra do cytoplasmy. Opožděné časné lytické proteiny jsou virové enzymy podílející se na replikaci virové DNA a proteiny ovlivňující proteasom-ubiquitinový systém. Mezi pozdní lytické proteiny patří kapsidové proteiny p18, p23 a p150, membránové glykoproteiny, tegumentové a maturační proteiny. (Roubalová, 2008)

5.1.5 Životní cyklus viru

Pro herpetické viry je charakteristické střídání dvou fází životního cyklu, a to fáze latentní a fáze lytické. Během fáze latentní je potlačena exprese strukturálních genů, DNA se replikuje synchronně s buněčnou DNA a transkripce je omezena pouze na latentní geny s regulační funkcí. Lytická fáze slouží viru k produkci velkého množství virových částic, které se uvolní lýzou buňky. Replikace virové DNA probíhá asynchronně, aktivuje se transkripce časných genů, exprimují se proteiny tvořící kapsidu a obal. (Roubalová, 2008)

Na obrázku č. 2 je zjednodušeně znázorněn životní cyklus EBV. Virus se většinou dostává do těla hostitele slinami, může se ale šířit i transfúzí krve nebo transplantací orgánu či buněk od infikovaného člověka. (Dunmire *et al.*, 2015) Při přenosu slinami se setkává nejdříve s epiteliálními buňkami orofaryngu a následně infikuje hlavní cílové buňky, B-lymfocyty. (Lünemann *et al.*, 2015) Virus však může za různých okolností infikovat i T-lymfocyty, NK buňky, buňky hladké svaloviny a pravděpodobně i folikulární dendritické buňky. (Chakravorty *et al.*, 2022)



Obr. 2: Zjednodušený model životního cyklu EBV

Viriony uvolněné z epiteliálních buněk v lytické fázi se dostávají do B-lymfocytů, kde probíhá latentní fáze. Stejně tak se může virus dostat do dalších imunitních buněk (T-lymfocyty, NK buňky). V naivních B-lymfocytech probíhá nejprve latence IIb/III, během které jsou exprimovány nukleární antigeny (EBNA), latentní membránové proteiny (LMP) a nekódující RNA (ncRNAs). Aktivované B-lymfocyty poté putují do tzv. zárodečného centra (germinal centre) lymfatického orgánu, spustí se latentní fáze IIa a repertoár exprimovaných proteinů se snižuje. Diferenciace B-lymfocytů na paměťové buňky ve fázi latence I/O může spustit reaktivaci lytické fáze.

Zdroj: Chakravorty, Afzali and Kazemian, 2022

Není zatím přesně známo, jak se virus dostává do epiteliálních buněk, existuje několik modelů a teorií. Recentní hypotézou je, že ve vstupu EBV do epiteliálních buněk hraje hlavní roli Eph receptor EphA2 (erythropoietin-producing human hepatocellular receptor). Další receptory na epiteliálních buňkách, které EBV využívá, jsou integriny, neuropilin-1 a non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA). (Chen and Longnecker, 2019)

V epiteliálních buňkách probíhá zejména lytická fáze. Ta se rozděluje na bezprostředně časnou, opožděně časnou a pozdní. Bezprostředně časná fáze je iniciována geny *BZLF1* (*ZEBRA/Zta*) a *BRLF1*. Produkty těchto genů fungují jako transkripční faktory a společně aktivují transkripci časných virových genů. Časné virové geny kódují proteiny potřebné k replikaci viru (např. virová DNA polymeráza). *BZLF1* také může aktivovat některé geny hostitelské buňky, a to TGF-beta, c-fos, tyrosinkinázu TKT, matrixové metalloproteinázy 1 a 9, a interleukin 10 (IL-10). Právě aktivace imunopresivních cytokinů TGF-beta a IL-10 může potenciálně negativně ovlivnit imunitní odpověď hostitele během lytické fáze infekce, zatímco indukce matrixových metalloproteináz může potenciálně indukovat metastázování EBV-pozitivních nádorových buněk. Pozdní lytické geny jsou aktivovány až po začátku replikace a většina z nich kóduje strukturální proteiny tvořící nukleokapsidu, obal, glykoproteiny na povrchu viru, tegument a maturační proteiny. Jedním z pozdních genů je také *BCLF1*, který kóduje vIL-10. VIL-10 je virový homolog cytokinu IL-10, který má schopnost potlačit imunitní odpověď hostitele a navodit toleranci. (Kenney, 2007)

Do B-lymfocytů se EBV dostává pomocí membránového glykoproteinu gp350/220 ve svém obalu, kterým se naváže na komplementový receptor CD21 (Fingerth *et al.*, 1984; Frade *et al.*, 1985; Nemerow *et al.*, 1987), a koreceptorem gp42 se naváže na receptor hlavního histokompatibilního komplexu MHC II. Třídí na povrchu B-lymfocytu. (Li *et al.*, 1997) Navázání na receptory spustí proces endocytózy a virus se dostává do buňky. (Tanner *et al.*, 1987) V B-lymfocytech je virus většinou v latentní fázi a do lytické fáze vstupuje zřídka a pouze za určitých situací, jednou z nich je diferenciace B-lymfocytu na plazmatickou buňku. V buňce se EBV pomocí EBNA-6 váže na mitochondriální ribozomální protein S18B-2 (MRPS18-2), který následně zprostředkovává vazbu s retinoblastomovým proteinem (pRb). pRB za fyziologických

podmínek váže jaderné transkripční faktory E2F a tím zastavuje transkripci určitých genů a brání nekontrolovanému množení buněk. EBV této vazbě zabraňuje, a to je jeden z faktorů vedoucích k blastické proliferaci. (Kashuba *et al.*, 2008)

U EBV se rozlišují 4 latentní fáze, během kterých jsou exprimované pouze určité geny. (Sausen *et al.*, 2021) Podle několika studií jsou s různými latentními fázemi asociovány různé typy nádorů, které jsou s EBV spojovány. Latentní fáze 1 je asociována s Burkittovým lymfomem, latentní fáze 2 s Hodgkinovým lymfomem, T-buněčným non-Hodgkinovým lymfomem, nasofaryngeálním a žaludečním karcinomem, a latentní fáze 3 se objevuje zejména u imunokompromitovaných pacientů, u post-transplantačních lymfoproliferativních onemocnění a lymfoproliferativních onemocnění u HIV pozitivních. (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012)

Reaktivace lytické fáze může být vyvolána diferenciací B-lymfocytů na plazmatické buňky po antigenní stimulaci BCR nebo diferenciací epiteliálních buněk. Může ji také vyvolat působení různých chemických látek, např. chemoterapeutika doxorubicin a gemcitabin. (Chakravorty *et al.*, 2022)

5.2 Onemocnění asociovaná s EBV

5.2.1 Infekční mononukleóza

První klinický popis tohoto onemocnění pochází z 80. let 19. století, kdy bylo popsáno německým pediatrem Pfeifferem jako glandulární horečka. (Pfeiffer, 1889) Název infekční mononukleóza poprvé použili Thomas P. Sprunt a Frank A. Evans v roce 1920 v bulletinu John' Hopkins Hospital. Několik let Sprunt a Evans pozorovali několik případů akutní infekce u dospělých doprovázené horečkou, bolestí v krku, mononukleární leukocytózou místo polymorfonukleární leukocytózy, zvětšením uzlin a slinivky. (Sprunt and Evans, 1920) O spojitosti EBV a infekční mononukleózy se začalo uvažovat až na konci 60. let 20. století, kdy se virem izolovaným z buněk Burkittova lymfomu zabývali manželé Werner a Gertruda Henleovi. (Henle *et al.*, 1968)

Jedná se o primární infekci EBV s inkubační dobou cca 6 týdnů, která je častá zejména u mladistvých a mladých dospělých. U dětí do 10 let bývá infekce často

inaparentní, kdežto u mladistvých má typické projevy. Nemoc se projevuje jako pseudomembranózní angína doprovázená krční lymfadenitidou. Má pozvolný začátek, následuje subfebrilie až horečka, bolest v krku, bolest svalů a kloubů, zduření tonsil a lymfatických uzlin zejména na krku. Krční mandle jsou pokryté šedobílými povlaky podobně jako u streptokokové angíny. Často se objevují petechie na měkkém patře (Holzelovo znamení, Obr. 3) a otoky okolo očí (Basseho znamení, Obr. 4). Klinické příznaky trvají zhruba dva týdny. (Votava *et al.*, 2003; Ambrožová, 2005; Roháčová, 2005)

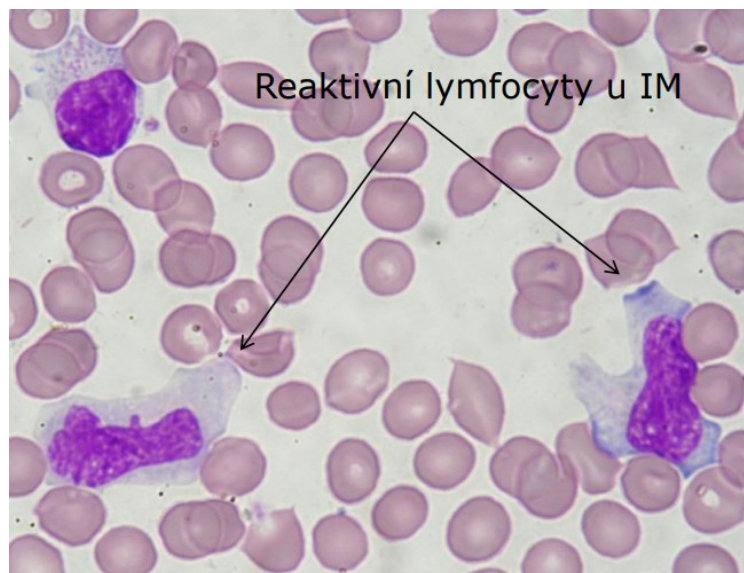


Obr. 3: Povlaky na mandlích a Holzelovo znamení na měkkém patře (Lobovská, 2002)



Obr. 4: Basseho znamení (Lobovská, 2002)

Laboratorně je doprovázena mírnou leukocytózou s relativní i absolutní lymfocytózou a nálezem atypických (tzv. reaktivních) lymfocytů (Obr. 5) v diferenciálním krevním obrazu a (většinou) pozitivními heterofilními protilátkami. Asi u jedné třetiny pacientů se objevuje hepatomegalie. U 80-90 % pacientů dochází k poškození jater, které je provázeno zvýšením jaterních enzymů (alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy, laktátdehydrogenázy). Zhruba u jedné poloviny pacientů dochází ke splenomegalii, která se může projevovat bolestmi v levém podžebří. Může dojít i k ruptuře sleziny, což je obávanou komplikací infekční mononukleózy. Dalšími komplikacemi, které se mohou objevit, jsou akutní dechová insuficience způsobená zduřením a povlaky na tonsilách, trombocytopenie, akutní hemolytická anémie, těžká neutropenie až agranulocytóza, encefalitida, Guillain-Barrého syndrom, periferní neuropatie, aseptická meningitida, myelitida, obrny hlavových nervů, psychózy, myokarditida a někdy také perikarditida. Výskyt nemoci bývá během celého roku, nevykazuje sezónní charakter a nevyskytují se hromadné nákazy. (Votava *et al.*, 2003; Bartošová, 2003; Ambrožová, 2005; Roháčová, 2005; Beneš, 2009; Pavelka, 2014)



Obr. 5: Reaktivní T-lymfocyty v nátěru periferní krve u pacienta s infekční mononukleózou

Barvení May-Grünwald a Giemsa-Romanowski, zvětšení 1000x

Zdroj: Fátorová, nedatováno (převzato z: <https://www.ipvz.cz/seznam-souboru/5222-vybrane-patologicke-nalezky-v-naterech-pk-modul-2.pdf>)

Podobné příznaky mohou vyvolat i jiné patogeny, zejména *cytomegalovirus*, *adenovirus*, intracelulární parazit *Toxoplasma gondii*. (Remington *et al.*, 1962; Evans *et al.*, 1968; Wahren *et al.*, 1969; Klemola *et al.*, 1970) Vzácněji pak *HHV6*, *HIV*, *rubeola virus* a *parvovirus*. (Blake *et al.*, 1976; Horwitz *et al.*, 1977; Steeper *et al.*, 1988, 1990) Onemocnění se v takovém případě nazývá syndrom infekční mononukleózy. (Beneš, 2009)

5.2.2 Burkittův lymfom

Burkittův lymfom byl poprvé popsán irským lékařem Dennisem Burkittem v roce 1958 jako sarkom postihující čelisti u afrických dětí (Obr. 6 a Obr. 7). Zmínky o tomto typu nádorů u dětí pochází již z roku 1938. Jde o velice agresivní typ tumoru a děti umíraly zhruba po dvou až třech měsících od prvních symptomů. Byl popsán i výskyt v dalších orgánech. Nejčastěji v nadledvinkách, ledvinách a játrech. Ložiska byla nalezena ale i ve štítné žláze, varlatech, srdci, žaludku, slinivce, slinných žlázách, lebce a stehenní kosti. Tehdy se původ Burkittova lymfomu vzhledem ke geografické distribuci a klimatickému faktoru spojoval s přenosem pomocí vektoru. (Burkitt, 1958) V roce 1964 byly v elektronovém mikroskopu u buněk z Burkittova lymfomu zachyceny virové částice, které byly popsány jako virus Epstein a Barrové. (Epstein *et al.*, 1964)

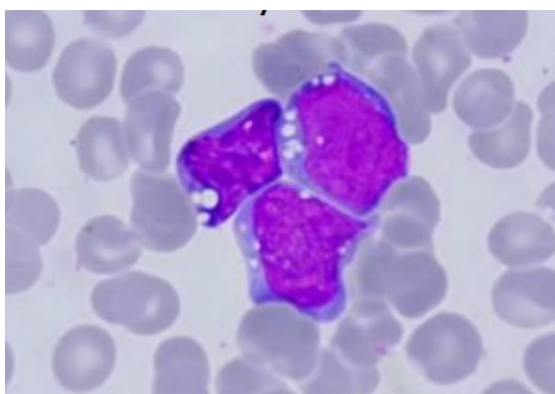


Obr. 6: Burkittův lymfom v pravé části mandibuly u 11 letého chlapce z Afriky (Burkitt, 1958)



Obr. 7: Burkittův lymfom zasahující do všech kvadrantů čelistí u 3 letého chlapce z Afriky (Burkitt, 1958)

Jde o velmi agresivní non-Hodgkinský zralý B-lymfom s charakteristickou chromozomální translokací *c-myc* protoonkogenu a silnou expresí znaku CD20. (Šmardová *et al.*, 2008) V klinickém obrazu se vyskytují tzv. B příznaky – noční pocení, horečky neinfekčního původu, váhový úbytek o více než 10 % hmotnosti za posledních 6 měsíců. Bývá přítomna velká masa tumoru (tzv. bulky disease) a časté je i extranodální postižení, zejména v GIT, CNS a mléčných žlázách. V nátěru periferní krve lze pozorovat charakteristické atypické lymfocyty s vakuolizací (Obr. 8). Rozlišují se 3 klinické varianty: endemická forma asoci. s EBV, sporadická forma a s imunodeficitem asociovaný BL. Léčba má být intenzivní a rychle zahájená. (Belada *et al.*, 2023)



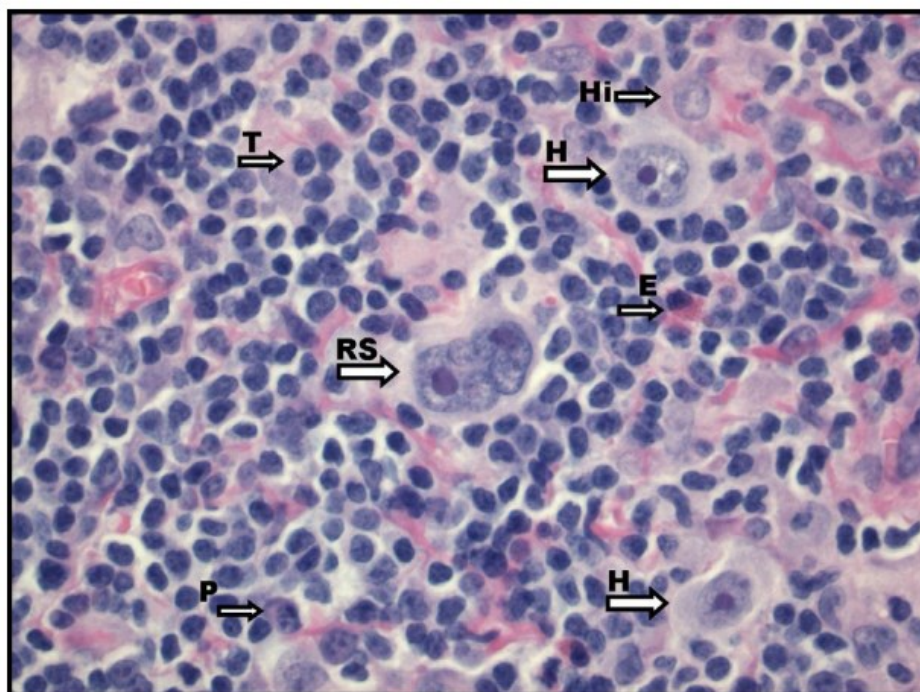
Obr. 8: Nález velkých atypických lymfocytů s vakuolizací v nátěru periferní krve u pacientů s BL

Barvení May-Grünwald a Giemsa-Romanowski, zvětšení 1000x.

Zdroj: Fátorová, nedatováno (převzato z: <https://www.ipvz.cz/seznam-souboru/5222-vybrane-patologicke-nalezky-v-naterech-pk-modul-2.pdf>)

5.2.3 Hodgkinův lymfom

V roce 1832 popsal doktor Thomas Hodgkin několik případů tumorů lymfatických uzlin a sleziny. (Hodgkin, 1832) Pro Hodgkinův lymfom (HL) je typický nález tzv. Hodgkinových buněk a buněk Reedové-Sternberga, které jsou základem k potvrzení diagnózy. Mononukleární Hodgkinovy buňky a polynukleární buňky Reedové-Sternberga (Obr. 9) vznikají mutací B-lymfocytů v zárodečném centru lymfatických uzlin a slinivky. Tyto buňky obvykle tvoří jen malé procento maligních buněk (1-10 %) v závislosti na typu HL, zbytek tumoru tvoří nemaligní T- a B-lymfocyty, plazmatické buňky, histiocyty, granulocyty, mastocyty, fibroblasty, mezenchymální a endoteliální buňky. (Drexler *et al.*, 1989; Drexler, 1992; Küppers *et al.*, 1994; Aldinucci *et al.*, 2002) Podle histologického nálezu se dělí na čtyři typy: typ I s převahou lymfocytů, typ II nodulárně-sklerotický, typ III smíšený a typ IV klasický.



Obr. 9: Histologický preparát Hodgkinova lymfomu

Preparát klasického HL barvený hematoxylinem a eosinem. Šipky ukazují typické maligní buňky HL (H – Hodgkinovy buňky, RS – buňky Reedové-Sternberga) a reaktivní buněčné infiltráty skládající se převážně z malých lymfocytů, T-lymfocytů (T), eozinofilů (E), plazmatických buněk (P) a histiocytů (Hi). Zvětšení 400x

Zdroj: Liu *et al.*, 2014

S EBV je spojován od 80. let 20. století, kdy se pomocí molekulárních metod podařilo detekovat EBV DNA, mRNA, latentní membránový protein (LMP) a EBERs v několika vzorcích biopsie Hodgkinova lymfomu nodulárně-sklerotického typu, smíšeného typu a v buňkách Reedové-Sternberga, ve vzorcích zbylých dvou typů HL virus detekován nebyl. (Weiss *et al.*, 1987, 1989; Anagnostopoulos *et al.*, 1989; Staal *et al.*, 1989; Brousset *et al.*, 1991; Hummel *et al.*, 1992) Následovaly studie z různých zemí světa, např. z Argentiny, Číny, Korei, Velké Británie, Austrálie, Kostariky, Spojených Arabských Emirátů, Egypta, Jordánu, Iránu, Řecka, Keni, Mexika, Peru, Hondurasu, USA atd. které potvrdily přítomnost LMP nebo EBERs v 50-100 % případů HL u dětí i dospělých. (Zhou *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1993; Ambinder *et al.*, 1993; Preciado *et al.*, 1995; Quintanilla-Martínez *et al.*, 1995; Weinreb *et al.*, 1996; Huh *et al.*, 1996) Novější studie se pak zaměřují i na vliv genetických faktorů, zejména genů pro HLA, v rozvoji EBV pozitivního i EBV negativního HL. (Diepstra *et al.*, 2005; Niens *et al.*, 2007; Hjalgrim *et al.*, 2010; Enciso-Mora *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Urayama *et al.*, 2012; Cozen *et al.*, 2014)

Incidence Hodgkinova lymfomu v ČR je poměrně nízká a dále mírně klesá. V roce 2018 tvořil pouze 0,4 % všech nově diagnostikovaných zhoubných novotvarů kromě nemelanomových kožních nádorů. Za rok 2018 přibylo 255 případů, tj. 2,4 na 100 000 osob, a to bylo o 5,2 % méně než předchozí rok. V porovnání výskytu u mužů a žen mírně převažuje výskyt u mužů, a to v poměru 1,5:1. Střední věk nově diagnostikovaných v období 2014-2018 v ČR byl 47 let. Nejvíce nově diagnostikovaných bylo ve věku 65-69 let u mužů a 25-29 let u žen. Mortalita Hodgkinova lymfomu v ČR je nízká a stabilně klesá. V roce 2018 tvořila 0,2 % všech úmrtí na zhoubné novotvary mimo nemelanomových kožních nádorů. (Krejčí *et al.*, 2018) V roce 2020 byla incidence HL ve světě 0,98 na 100 000 lidí. Z celkového počtu 83 087 nových diagnostikovaných případů bylo 38,2 % v Asii, 23,9 % v Evropě, 13 % v Africe, 12,8 % v latinské Americe a Karibiku a 10,9 % v Severní Americe. (Huang *et al.*, 2022)

5.2.4 Další lymfoproliferativní onemocnění spojená s EBV

Mimo Burkittův a Hodgkinův lymfom je EBV spojován s různými typy dalších lymfoproliferativních onemocnění, která jsou většinou asociovaná s primárním nebo

sekundárním imunodeficitem. U pacientů s kompromitovanou T-buněčnou imunitou, např. po transplantaci vlivem imunosupresivní léčby nebo v pozdním stádiu AIDS, je vysoké riziko vzniku B-lymfomů. T-lymfocyty jsou hlavním efektoem antivirové a protinádorové imunity, bez nich se EBV rychle šíří, napadá B-lymfocyty a ty mohou nekontrolovaně proliferovat. (Hamilton-Dutoit *et al.*, 1993; Sebelin-Wulf *et al.*, 2007) Pacienti po transplantaci jsou velmi ohroženi rozvojem i jiných lymfoproliferativních onemocnění, označovaných souhrnně posttransplantační lymfoproliferativní onemocnění (PTLD), která ale nejsou vždy prokazatelně asociovaná s EBV. (Leblond *et al.*, 1998; Dotti *et al.*, 2000) Většina lymfomů asociovaných s EBV bývá diagnostikována do 1 roku od transplantace, kdy je pacient nejvíce imunosuprimován a reaguje na snížení imunosupresivní léčby. (Opelz and Döhler, 2004) Vyšší riziko rozvoje PTLD bylo pozorováno u dětí, které před transplantací neprodělaly primární infekci EBV a transplantovaný orgán dostaly od EBV pozitivního dárce. (Jain *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2008)

5.2.5 Nasofaryngeální karcinom

Nasofaryngeální karcinom (NPC) se objevuje se po celém světě, avšak nejvyšší výskyt do roku 2002 byl zaznamenán ve východní a jihovýchodní Asii. (Li *et al.*, 2009) Stejně tak i v roce 2010. Muži jsou dvakrát více zatíženi tímto typem karcinomu než ženy. (Khan and Hashim, 2014) S EBV je spojován už od 70. let minulého století, kdy u pacientů v různých stádiích nasofaryngeálního karcinomu byly detekovány vysoké titry specifických protilátek proti EBV v séru a EBV DNA v biopsii karcinomu. (Henle *et al.*, 1970; zur Hausen *et al.*, 1970; de Schryver *et al.*, 1974; Andersson-Anvret *et al.*, 1977) Výzkumy naznačují, že EBV je nezbytným faktorem, ale vzhledem k promořenosti populace po celém světě a ke geografické a etnické distribuci NPC, pravděpodobně existuje více faktorů podílejících se na vzniku tohoto typu karcinomu. Velmi častý je i familiární výskyt. Výzkumy se zaměřují zejména na konkrétní haplotypy HLA jako rizikové faktory, avšak celogenomové asociační studie ukazují na možnou spojitost i s geny mimo MHC region. (Chan *et al.*, 1983; Feng *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003, 2005; Hu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010, 2012; Bei *et al.*, 2016; Tse *et al.*, 2009)

Více než 80 % případů rané fáze NPC jsou léčitelné radioterapií a chemoterapií, avšak tato léčba je zatížena značnou toxickou náloží, jejíž následky si pacienti často nesou po zbytek života. (Comoli *et al.*, 2005)

V roce 2018 tvořily zhoubné nádory hlavy a krku (včetně nasofaryngeálního karcinomu) pouze 3 % všech nově diagnostikovaných zhoubných onemocnění bez nemelanomových kožních nádorů v ČR. (Krejčí *et al.*, 2018) Bližší informace k výskytu pouze nasofaryngeálního karcinomu v ČR nejsou bohužel známy.

5.3 Léčba a profylaxe

Léčba IM je většinou pouze symptomatická. Podávají se antipyretika, případně obklady na krk a hepatoprotektiva. K potlačení případné sekundární bakteriální infekce se mohou předepsat antibiotika penicilinové řady, makrolidy nebo cefalosporiny. Antibiotika aminopenicilinová (např. amoxicilin, ampicilin), ale i kotrimoxazol jsou kontraindikována, protože mohou vyvolat výsev typického makulopapulózního exantému (Obr. 10). (Kleinerová, 2005) Při těžším průběhu doprovázeném výraznou obstrukcí dýchacích cest, hemolytickou anémií nebo trombocytopenií, se krátkodobě podávají kortikosteroidy, případně i antivirotika. Dosud neexistuje kauzální terapie. (Beneš, 2009) Antivirotika inhibující replikaci viru, tzv. nukleosidové analogy (např. aciklovir, ganciklovir a tenofovir), nemají efekt na latentně infikované buňky, účinkují pouze v lytické fázi infekce. (Datta *et al.*, 1980; Andersson *et al.*, 1985; Ernberg and Andersson, 1986; Andersson *et al.*, 1987; Drosu *et al.*, 2020)



Obr. 10: Makulopapulózní exantém při IM po podání aminopenicilinových ATB

Zdroj: Rozsypal, nedatováno
(převzato z: <https://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/elern01/varic1.htm>)

Existuje několik studií vakcín, v zásadě se jedná o vakcíny profylaktické nebo terapeutické. Všechny studie profylaktických vakcín se zaměřují na membránový glykoprotein gp350/220, kterým se EBV váže na B-lymfocyty a zprostředkovává průnik do buněk. Tento glykoprotein je také jedním z cílů imunitního systému. (Nemerow *et al.*, 1987; Tanner *et al.*, 1987; Khyatti *et al.*, 1991; Jean-Pierre *et al.*, 2021) Bylo testováno několik forem vakcín. První vakcína byla vyvinutá v roce 1995 a byla to vakcína s živým virovým vektorem (vaccinia virus) exprimujícím gp350/220, která se ale nedostala do klinických studií kvůli standardům biologické bezpečnosti vakcín. (Gu *et al.*, 1995) Poté až v roce 2007 (Moutschen *et al.*, 2007) publikovali dvě klinické studie tři formy vakcíny. Všechny tři obsahovaly rekombinantní gp350. První vakcína byla bez adjuvans, zbylé dvě obsahovaly adjuvans, a to samotný hydroxid hlinitý nebo kombinaci s lipidem (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A). V tomto roce začala 2. fáze klinické studie, která měla potvrdit bezpečnost a imunogenicitu této vakcíny. Vakcína prokázala účinnost v prevenci rozvoje infekční mononukleózy, ale neprokázala účinnost proti asymptomatické EBV infekci. (Sokal *et al.*, 2007) O dva roky později proběhla studie vakcíny s rekombinantním gp350 a hydroxidem hlinitým, která zkoumala preventivní účinek vakcíny proti rozvoji potransplantačního lymfoproliferativního onemocnění (PTLD) u EBV séronegativních dětí s chronickým renálním onemocněním čekajících na transplantaci. V této studii se požadovaný účinek vakcíny nepotvrdil. (Rees *et al.*, 2009)

Další výzkumy ukázaly vysoký potenciál vakcíny s rekombinantním gp350/220 s nanočásticemi ferritinu. (Kanekiyo *et al.*, 2015) Klinickou studii této vakcíny zahájil National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) v roce 2022 a plánované ukončení studie je v roce 2025. (NIAID, 2023)

Biotechnologická společnost Moderna pracuje na dvou klinických studiích profylaktických mRNA vakcín, mRNA-1189 a mRNA-1195. Vakcína mRNA-1189 se skládá z lipidových nanočástic obalujících čtyři úseky mRNA kódujících čtyři povrchové proteiny EBV (gp220, gp42, gH and gL). Klinická studie této vakcíny byla zahájena koncem roku 2021 a očekávané ukončení je v roce 2025. (ModernaTX, Inc., 2023a) Klinická studie vakcíny mRNA-1195 odstartovala teprve v roce 2023 a má cílit na

prevenci rozvoje s EBV asociovaných posttransplantačních lymfoproliferací a roztroušené sklerózy. (ModernaTX, Inc., 2023b)

Terapeutické vakcíny proti EBV cílí na stimulaci cytotoxické odpovědi T-lymfocytů proti nádorovým buňkám infikovaným EBV. Většina těchto vakcín se zaměřuje na léčbu nasofaryngeálního karcinomu a lymfoproliferativních EBV pozitivních onemocnění. Jedná se autologní vakcíny založené na odběru, kultivaci vlastních imunitních buněk, většinou dendritických buněk stimulujících T_c-lymfocyty nebo přímo T_c-lymfocytů, které jsou stimulovány EBV antigeny a následně aplikovány zpět do těla pacienta. (Lin *et al.*, 2002; Comoli *et al.*, 2005; Heslop *et al.*, 2010; Secondino *et al.*, 2012; Icheva *et al.*, 2013; Bollard *et al.*, 2014; Secondino *et al.*, 2023) V praxi jsou součástí tzv. buněčné terapie, která tvoří moderní, specifický, slibný, avšak poměrně náročný přístup k léčbě zhoubných novotvarů a lymfoproliferací. (Jean-Pierre *et al.*, 2021; Secondino *et al.*, 2023)

5.4 Laboratorní diagnostika EBV

5.4.1 Heterofilní protilátky

Heterofilní protilátky jsou protilátky, které mají schopnost reagovat s antigeny, které jsou zcela odlišné a fylogeneticky nepříbuzné antigenům běžně vyvolávajícím protilátkovou odpověď. J. R. Paul a W. W. Bunnell studovali spojitost těchto protilátek s různými klinickými stavy, zejména sérovou nemocí, revmatickou horečkou, tuberkulózou, syfilitidou atd. U pacienta s infekční mononukleózou zachytili abnormálně vysoké titry heterofilních protilátek. Výsledky potvrdili na dalších pacientech s infekční mononukleózou. (Paul and Bunnell, 1932)

Vyšetřují se pomocí Paul-Bunnellovy reakce (PBR), kterou se dnes všeobecně označuje sérologické vyšetření heterofilních protilátek k průkazu infekční mononukleózy EBV etiologie. (Votava, 2004) Při původní PBR dochází při pozitivitě k aglutinaci beraních erytrocytů a následné kontrole specifity vysycovacími testy pomocí suspenze připravené z morčecích ledvin. (Paul and Bunnell, 1932) V následujících letech došlo k mnoha modifikacím PBR, např. využití hovězích erytrocytů k aglutinaci a suspenze buněk z hovězího srdce k vysycování přineslo větší

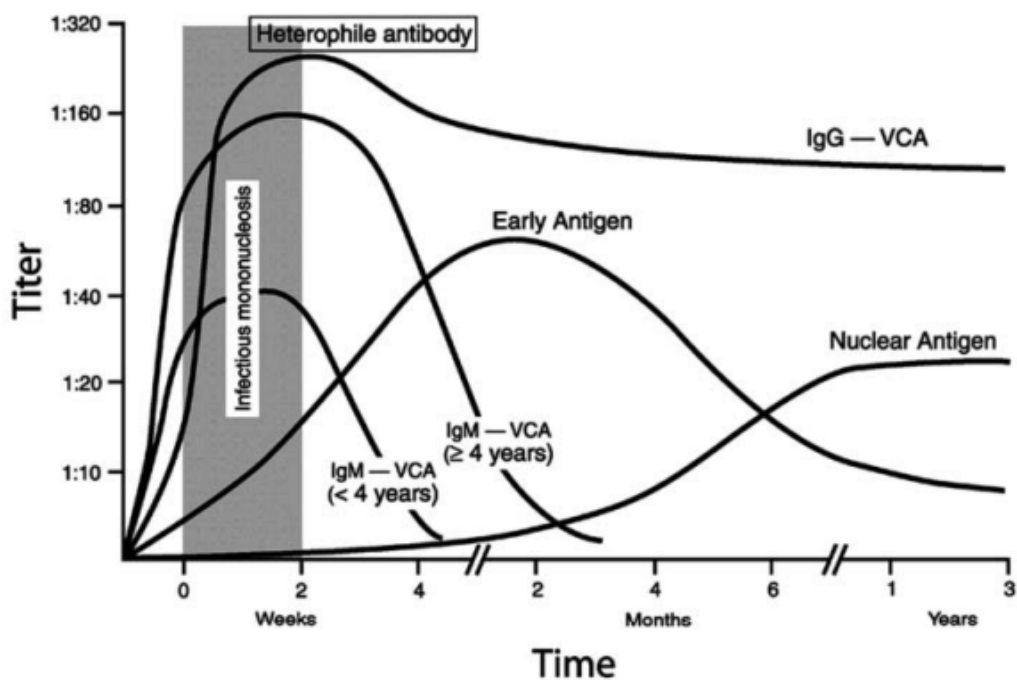
specifitu testu oproti využití ovčích erytrocytů a morčecích ledvin. (Davidsohn, 1937) V současné době se používají převážně rychlé testy na principu imunochromatografie. Jedním z takových testů je tzv. IM test (Infectious mononucleosis test), který je používán i v naší laboratoři a další popis je uveden v experimentální části práce.

Stanovení heterofilních protilátek je levným, ale ne tak specifickým nástrojem k rychlému zjištění, zda má pacient infekční mononukleózu způsobenou EBV. Tyto IgM protilátky jsou polyvalentního charakteru a jsou produkovány během masivní aktivace B-lymfocytů. (Roubalová, 2010) Záchyt pozitivních protilátek u dětí do 5 let věku s potvrzenou infekční mononukleózou je poměrně vzácný, proto není toto vyšetření vhodným diagnostickým nástrojem u dětí do 5 let věku. (Fleisher *et al.*, 1979) Komparativní studie 9 diagnostických souprav ukázala, že senzitivita testu heterofilních protilátek u dětí do 13 let věku se pohybuje v rozmezí 25-50 %. (Linderholm *et al.*, 1994)

5.4.2 Virově specifické protilátky

Během infekce EBV buňky imunitního systému reagují a tvoří proti EBV specifické protilátky. Stanovují se protilátky proti virovému kapsidovému antigenu VCA (Viral Capsid Antigen), časnému antigenu EA (Early Antigen) a nukleárnímu antigenu EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen). Vyšetření těchto markerů v souvislosti s klinickým stavem dá lékaři informaci, v jaké fázi infekce se pacient přibližně nachází (Tab. 1). Pro akutní fázi infekce jsou charakteristické protilátky proti VCA ve třídě IgM, které jsou detekovány ke konci prvního týdne příznaků, a ve třídě IgG několik dní poté (Obr. 11). Protilátky proti EA se běžně stanovují ve třídě IgG a detekovatelné jsou kolem třetího týdne od počátku příznaků. Komplex EA obsahuje dvě odlišné antigenní komponenty detekovatelné imunofluorescencí, D složku (z angl. *diffuse*) a R složku (z angl. *restricted*). Difúzní složka je specifická pro primoinfekci, bývá pozitivní dříve než R složka a případně se může objevit i u reaktive. R složka je pozitivní spíše v pozdější fázi infekce a může se také objevit při reaktivaci. (Henle *et al.*, 1971) U primární infekce v dětském věku se někdy objevuje nejdříve pozitivita R složky a až poté D složky. (Fleisher *et al.*, 1979) Pro latentní fázi jsou charakteristické IgG protilátky proti EBNA, které jsou detekovatelné až zhruba od 90. dne onemocnění. Stejně tak

i anti-VCA IgG jsou pozitivní během latentní fáze (Obr. 11). (Hejnar, 2001; Pavelka, 2014) Průkaz EBV specifických protilátek se nejvíce uplatňuje zejména při diagnostice primoinfekcí. K rozlišení primární infekce se používá také stanovení avidity IgG protilátek proti VCA, které vypovídá o vazebné schopnosti protilátek. Při primární infekci se zpravidla tvoří protilátky nízkoavidní, které jsou během 2-3 měsíců nahrazeny protilátkami vysokoavidními. Protilátky anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA IgG, anti-EA IgG se stanovují metodami na principu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), nepřímé imunofluorescence a imunoblottingu. (Roubalová, 2010)



Obr. 11: Dynamika tvorby protilátek při EBV infekci

Na obrázku vidíme průběh detekovatelných protilátek v závislosti na čase a množství, resp. titru. V počátku onemocnění lze detekovat protilátky proti kapsidovému antigenu (VCA), časnému antigenu (EA) a heterofilní protilátky. V pozdější fázi onemocnění se tvoří protilátky proti nukleárnímu antigenu (EBNA). IgG protilátky proti VCA a EBNA přetrvávají obvykle celoživotně.

Zdroj: Jenson et al., 1997

Tab. 1: Interpretace serologických nálezů vyšetření EBV specifických protilátek

Stádium infekce	Základní vyšetření			Doplňková vyšetření			
	IgM proti VCA	IgG proti VCA	IgG proti EBNA	IgM proti EBNA	IgM proti EA	IgG proti EA	IgA proti VCA
Primární infekce	+ / +++	++ (nízká avidita)	-	++	++	++	+++
Latence	-	++ (vysoká avidita)	++	-	-	+/- ¹	-
Reaktivace	+	+++ (vysoká avidita)	+++	+/-	+/-	+++	++
Chronická aktivní infekce	Nemá charakteristický vzorec protilátek (pro diagnostiku je nezbytný průkaz vysoké virové nálože v krvi pomocí PCR)						

¹Nízké hladiny IgG protilátek proti EA má až 20 % zdravých lidí

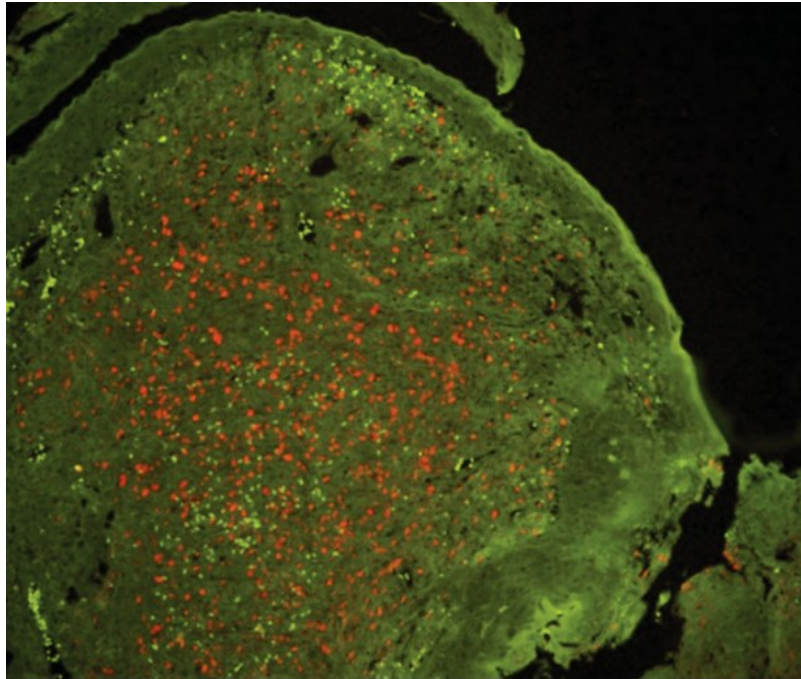
Zdroj: Roubalová, 2010 (přepřacováno do tabulky)

5.4.3 Přímý průkaz

Z metod přímého průkazu se pro detekci EBV nejvíce uplatňuje molekulárně biologická diagnostika virové DNA pomocí kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (rt-PCR). Vyšetření EBV DNA má význam zejména u imunodeficientních pacientů, kteří protilátky obvykle netvoří, a jsou nejvíce ohroženi EBV asociovanou lymfoproliferativní nemocí (EBV-LPD). Kvantitativní stanovení virové nálože v periferní krvi se dá využít i jako prediktivní marker u potransplantační lymfoproliferativní nemoci (PTLD). (Smets *et al.*, 2002) Po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk se doporučuje monitorovat množství EBV DNA v krvi pacienta jednou týdně po dobu alespoň 3 měsíců, případně i déle. (Hubáček, 2013)

PCR lze provést z různých typů klinických vzorků. Druh materiálu závisí na účelu vyšetření a klinickém stavu pacienta. Například u infekční mononukleózy či Hodgkinova lymfomu se používá většinou plazma, protože se detekují virové partikule a volná virová DNA uvolněná z místa proliferace. U dalších stavů, například potransplantační EBV lymfoproliferace, se volí vyšetření z plné krve, protože většina virových částic se vyskytuje v cirkulujících buňkách, případně průkaz virové DNA z bioptického vzorku pomocí hybridizace *in situ*. (Hubáček, 2013) Pro rozlišení, zda se jedná o reaktivní

lymfatickou tkáň přirozeně infiltrovanou latentně infikovanými EBV-pozitivními B-lymfocyty nebo přímo o proliferaci těchto buněk, se může využít imunohistochemický průkaz virové latentní RNA, tzv. EBERs, pomocí hybridizace *in situ* fluorescenčně značenými sondami (Obr. 12). (Roubalová, 2010)



Obr. 12: EBERs v biopsii nasofaryngeálního karcinomu detekované pomocí FISH

Červené zbarvení značí pozitivní fluorescenční signál EBERs v jádře buněk nasofaryngeálního karcinomu. Zvětšení 100x.

Zdroj: Peng et al., 2011

Někteří autoři studií se domnívají, že sérum nebo plazma všeobecně není žádoucím klinickým vzorkem k monitoraci virové nálože, protože nedetekuje přítomnost viru v buňkách. Ve studii z roku 2001 porovnali množství detekované EBV DNA ve vzorcích plné krve a séra/plazmy u pacientů s různými EBV-asociovanými onemocněními a záchyt virové DNA v plné krvi byl 100 %, kdežto u vzorků séra/plazmy od stejných pacientů byly značné rozdíly, hlavně ve skupině PTLD pacientů. (Stevens *et al.*, 2001) Ke stejnému závěru došli i autoři studie z roku 2016. (Ito *et al.*, 2016)

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Vyšetřovaný materiál

Vyšetření protilátek se provádí většinou ze séra nebo plazmy získané odběrem venózní krve. Může se provádět i z mozkomíšního moku, ale výsledek je pouze orientační a neslouží k průkazu tvorby intratekálních protilátek. Pro získání séra se krev ve zkumavce bez antikoagulačního činidla musí nechat minimálně 20 minut odstát, aby proběhla kompletní koagulace, a poté centrifugovat po dobu 10 minut při 2000 otáčkách za minutu. Pro vyšetření z plazmy se krev odebírá do zkumavky s antikoagulačním činidlem (např. K₃EDTA). (VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o., 2019)

Vyšetřovaný materiál pocházel z laboratoře Vidia-Diagnostika a odběr materiálu proběhl v odběrových místnostech nebo u žádajícího lékaře či nemocničního oddělení a byl transportován do laboratoře.

6.2 Průkaz heterofilních protilátek IM testem

K vyšetření byl použit rychlý imunochromatografický test od firmy Inter Medical určený k profesionálnímu *in vitro* použití. Toto vyšetření se provádí ze séra, plazmy a plné venózní nebo kapilární krve.

Pomůcky a reagenty:

Diagnostická souprava obsahuje testovací kazetky, pufr, pozitivní a negativní kontrolu a kapátka (Obr. 13). Nezbytnou pomůckou k testu je minutka.



Obr. 13: Diagnostická souprava pro vyšetření heterofilních protilátek

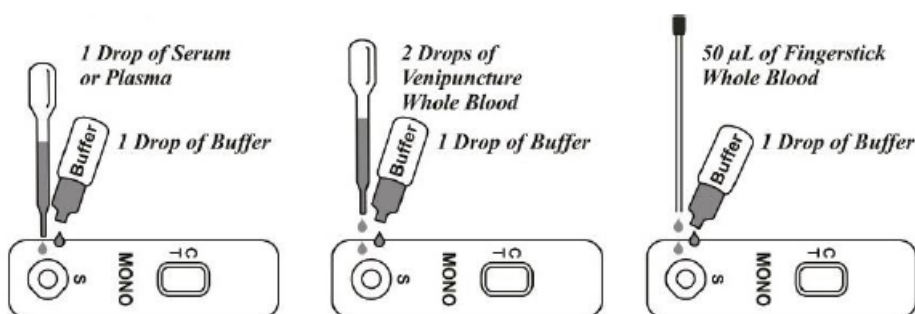
Zdroj: autor práce

Princip metody:

Vzorek vzlíná spolu s pufrům po chromatografické membráně. V regionu testovací linie je extrahovaný antigen hovězích erytrocytů potažený na částicích, které tvoří označenou vrstvu. Pokud jsou ve vzorku přítomny heterofilní protilátky, reagují s antigenem a objeví se zbarvení testovací linie. Pokud ve vzorku heterofilní protilátky nejsou, linie se nezbarví. Jako kontrola postupu slouží kontrolní linie, která se zbarví, byl-li použit správný objem vzorku a správně vzlínal po membráně. Jestliže se kontrolní linie nezbarví, test není validní a musí se zopakovat.

Pracovní postup:

1. Vyndat diagnostickou soupravu z lednice a nechat vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Vyndat testovací kazetku z obalu a položit ji na čistý rovný povrch.
3. Pro vyšetření ze séra/plazmy: kapátkem nasát vzorek séra a přenést 1 kapku (asi 25 μ l) do jamky na vzorek (S) na kazetce.
Pro vyšetření venózní krve: kapátkem kapat 2 kapky do jamky pro vzorek.
Pro vyšetření kapilární krve (odběr z prstu): z kapiláry vytlačit cca 50 μ l do jamky pro vzorek (Obr. 14).
4. Ke vzorku přidat 1 kapku pufru (asi 55 μ l).
5. Po 5 minutách odečíst výsledek.

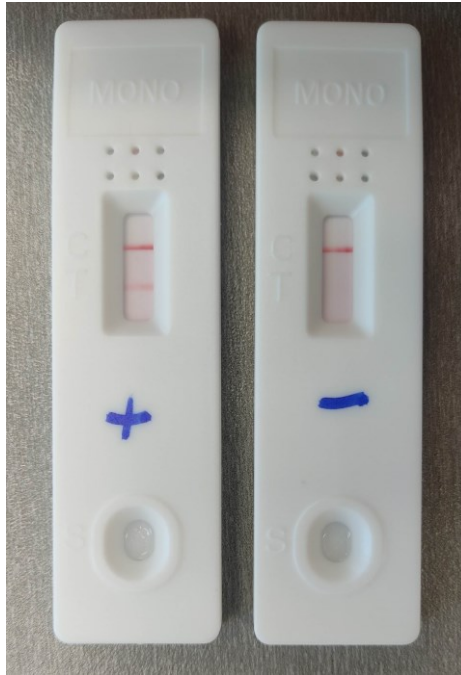


Obr. 14: Postup provedení IM testu ze séra/plazmy, venepunkce a odběru z prstu

Zdroj: Inter Medical, 2019

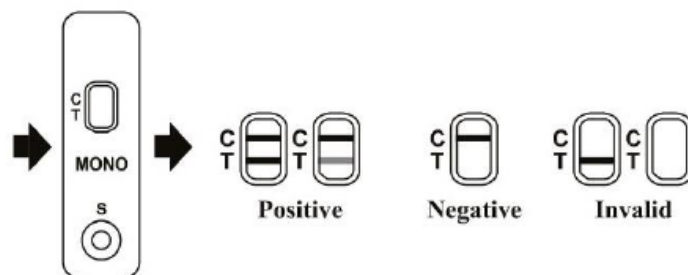
Interpretace testu:

Chromatografická destička má dvě linie. Jedna je kontrolní, druhá testovací. Test je pozitivní, pokud se obě linie zbarví. Test je negativní, pokud se zbarví jen kontrolní linie a testovací ne (Obr. 15). Pokud se zbarví pouze testovací linie, test není validní (Obr. 16).



Obr. 15: Pozitivní a negativní IM test

Zdroj: autor práce



Obr. 16: Interpretace IM testu

Zdroj: Inter Medical, 2019

6.3 Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)

Touto metodou se detekují IgG protilátky proti EBNA, IgM protilátky proti VCA a IgG protilátky proti VCA. K testování se používá plně automatický analyzátor Liaison XL firmy DiaSorin (Saluggia, Itálie) pracující na principu CLIA (Obr. 17).



Obr. 17: Automatický analyzátor Liaison XL

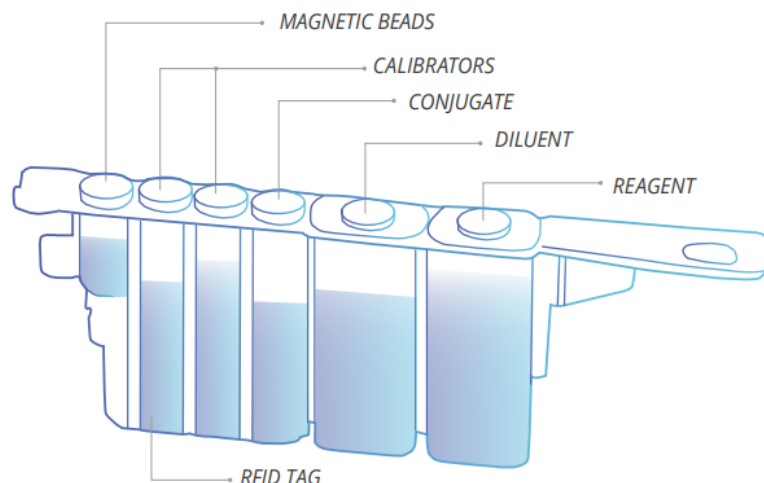
- 1 – dotyková obrazovka
- 2 – zásobníky na kyvety a špičky
- 3 – prostor pro vkládání vzorků ve stojanech
- 4 – startovací činidla
- 5 – chlazený prostor pro reagenční integrály
- 6 – zásobníky pro destilovanou vodu a promývací roztok
- 7 – nádoba na použité kyvety a špičky

Zdroj: Lifeline Diagnostics (převzato z:

<https://www.lifeline-diag.com/products?group=Immunology&ver=v202102>)

Pomůcky a reagenty:

Reagenty jsou dodávány ve formě tzv. reagenčních integrálů, které obsahují vše potřebné ke kalibraci i analýze (Obr. 18). Kontroly jsou dodávány zvlášť a stanovují se každý den před testováním patientských vzorků. Veškeré reagenty s kalibrátory a kontroly jsou využívány výhradně od firmy DiaSorin. Obsah jednotlivých reagenčních integrálů popisují Tab. 2, 3 a 4.



Obr. 18: Obecné schéma reagenčního integrálu

Magnetic beads – magnetické částice; calibrators – kalibrátory; conjugate – konjugát; diluent – ředící roztok pro vzorky; reagent – další reagentie (podle konkrétního typu integrálu);

Radio frequency identification (RFID) tag – radiofrekvenční identifikační štítek

Zdroj: Brožura Liaison XL, DiaSorin (převzato z:

https://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati/liaisonr_xl_brochure_m0870004_248g_lr.pdf)

Tab. 2: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření EBV IgM

Magnetické částice (2,3 mL)	SORB	Magnetické částice potažené kapsidovým antigenem viru Epstein-Barrové, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, < 0,1% azidu sodného.
Kalibrátor 1 (0,55 mL)	CAL1	Lidské sérum/plazma s nízkými hladinami protilátek IgM proti EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztahena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Kalibrátor 2 (0,55 mL)	CAL2	Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami protilátek IgM proti EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální modré barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztahena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Pufr A (25 mL)	BUFA	Kozí IgG proti lidským IgG (absorpční reagentie), kozí sérum, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální modré barvivo.
Konjugát (23 mL)	CONJ	Myší monoklonální protilátky proti lidským IgM konjugované s derivátem isoluminolu, nespecifické IgG (myší polyklonální), hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, ochranné látky.
Počet testů		100

Zdroj: Metodický list LIAISON® EBV IgM ([REF] 310500), DiaSorin, 2022

Tab. 3: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření VCA IgG

Magnetické částice (2,3 mL)	SORB	Magnetické částice potažené kapsidovým antigenem viru Epstein-Barrové, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, < 0,1% azidu sodného.
Kalibrátor 1 (3,2 mL)	CAL1	Lidské sérum/plazma s nízkými hladinami protilátek IgG proti VCA EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztahena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Kalibrátor 2 (3,2 mL)	CAL2	Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami protilátek IgG proti VCA EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální modré barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztahena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Roztok k ředění vzorků (2 x 28 mL)	DILSPE	Hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo.
Konjugát (23 mL)	CONJ	Myší monoklonální protilátky proti lidským IgG konjugované s derivátem isoluminolu, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, ochranné látky.
Počet testů		100

Zdroj: Metodický list LIAISON® VCA IgG ([REF] 310510), DiaSorin, 2022

Tab. 4: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření EBNA IgG

Magnetické částice (2,3 mL)	SORB	Magnetické částice potažené syntetickým peptidem EBNA-1, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, < 0,1% azidu sodného.
Kalibrátor 1 (3,2 mL)	CAL1	Lidské sérum/plazma s nízkými hladinami protilátek IgG proti EBNA EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztažena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Kalibrátor 2 (3,2 mL)	CAL2	Lidské sérum/plazma s vysokými hladinami protilátek IgG proti EBNA EBV, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální modré barvivo. Koncentrace kalibrátoru (U/mL) je vztažena k internímu laboratornímu preparátu protilátky.
Roztok k ředění vzorků (2 x 28 mL)	DILSPE	Hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, neutrální žluté barvivo.
Konjugát (23 mL)	CONJ	Myší monoklonální protilátky proti lidským IgG konjugované s derivátem isoluminolu, hovězí sérový albumin, fosfátový pufr, 0,2% ProClin® 300, ochranné látky.
Počet testů		100

Zdroj: Metodický list LIAISON® EBNA IgG ([REF] 310520), DiaSorin, 2020

Princip metody:

Specifické protilátky, pokud jsou ve vzorku obsaženy, se navážou na magnetické částice potažené syntetickým antigenem (p18 pro detekci anti-VCA IgM a IgG, EBNA-1 pro detekci anti-EBNA IgG). Na navázané protilátky na částicích se připojí myší monoklonální protilátky proti lidským IgG (pro detekci IgG) nebo proti lidským IgM (pro detekci IgM) značené derivátem isoluminolu. Následně se přidá startovací činidlo a dochází k indukci chemiluminiscenční reakce. Světelný signál se měří fotonásobičem v relativních světelných jednotkách (RLU) a je přímo úměrný množství navázaného konjugátu, resp. množství navázaných vyšetřovaných protilátek. Reagenční integrál pro vyšetření IgM (Tab. 2) protilátek obsahuje oproti ostatním integrálům ještě tzv. Pufr A, který obsahuje kozí protilátky proti lidským IgG a slouží jako absorpční činidlo k odstranění interference lidských IgG protilátek.

Pracovní postup:

Po inicializaci analyzátoru se nejdříve stanovují kontroly, aby byla zajištěna kontrola kvality vyšetření. Následně se vzorky vloží do stojánku na vzorky určenému k vkládání vzorků do analyzátoru Liaison XL. Stojánek se vzorky se zasune do prostoru pro vkládání vzorků a kontrol. Přístroj automaticky načte požadovaná vyšetření z laboratorního informačního systému (LIS). Po načtení vyšetření se zahájí analýza tlačítkem Start na dotykové obrazovce. Po dokončení analýzy je potřeba výsledky exportovat do LIS.

Hodnocení testu:

Analyzátor automaticky spočítá koncentraci protilátek v jednotkách U/mL a vyhodnotí

výsledky (viz Tab. 5). Rozsah testu EBV IgM je 10 až 160 U/mL, VCA IgG 10 až 750 U/mL a EBNA IgG 3 až 600 U/mL. Pokud se výsledek pohybuje nad rozsahem testu, mohou se vzorky testovat v analyzátoru znovu s nastavením požadovaného ředění a výsledek je následně automaticky vynásoben dilučním faktorem.

Tab. 5: Interpretace výsledků vyšetření EBV specifických protilátek metodou CLIA

	Negativní	Nejasný	Pozitivní
VCA IgM	< 20 U/mL	20-40 U/mL	≥ 40 U/mL
VCA IgG	< 20 U/mL	-	≥ 20 U/mL
EBNA IgG	< 5 U/mL	5-20 U/mL	≥ 20 U/mL

Zdroj: Metodický list LIAISON® EBV IgM ([REF] 310500), VCA IgG ([REF] 310510) a EBNA IgG ([REF] 310520), DiaSorin, 2022 (přepřeváděno z textu do tabulky)

6.4 Nepřímá imunofluorescence (NIF)

Vyšetření EBV specifických protilátek imunofluorescenčně patří mezi tzv. zlatý standard. Diagnostické soupravy pro imunofluorescenci od firmy Vidia obsahují více antigenů než soupravy pro vyšetření chemiluminiscenční metodou. Nicméně není v možnostech laboratoře, a většina lékařů to ani nevyžaduje, vyšetřovat všechny pacienty imunofluorescenčně. Vyšetření se tedy provádí v případě, že lékař požaduje vyšetření imunofluorescencí nebo jsou výsledky vyšetření chemiluminiscencí nejasné.

K vyšetření se používají diagnostické soupravy IF-VIDITEST od firmy Vidia spol. s r.o. Detekují se IgM a IgG protilátky proti antigennímu komplexu kapsidy (VCA) a IgG protilátky proti časnému antigenu (EA). Ke zpracování sklíček pro vyšetření IgG protilátek se používá automatický přístroj Helmed Processor (Obr. 19) firmy Aesku.Diagnostics GmbH and Co. KG (Wendelsheim, Německo), který je pravidelně validován.



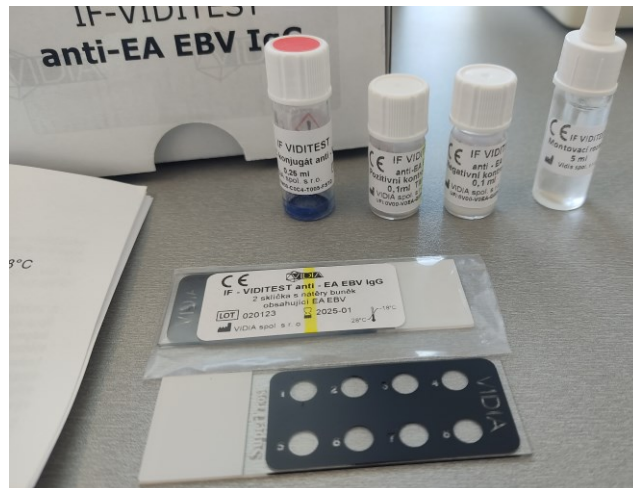
Obr. 19: Automatický přístroj pro zpracování IF sklíček Helmed Processor

Zdroj: autor práce

Pomůcky a reagensie:

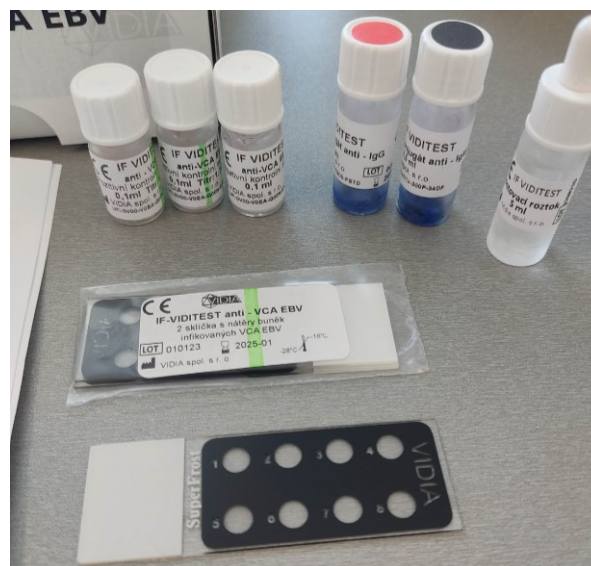
Diagnostická souprava IF-VIDITEST anti-EA IgG obsahuje rastrovaná podložní sklíčka s fixovanými nátěry indukovaných buněk Raji (Burkittův lymfom), lyofilizovaná IgG pozitivní a negativní lidská kontrolní séra, lyofilizované zvířecí protilátky proti lidskému IgG značené fluorescein-izothiokyanátem (FITC) (konjugát), montovací roztok, certifikát diagnostické soupravy a návod na použití soupravy. (Obr. 20) Diagnostická souprava IF-VIDITEST anti-VCA obsahuje rastrovaná podložní sklíčka s fixovanými nátěry buněk lidské lymfomové linie P3HR1 latentně infikované EBV, lyofilizovaná IgM a IgG pozitivní a negativní lidská kontrolní séra, lyofilizované zvířecí protilátky proti lidskému IgG (anti IgG FITC konjugát), lyofilizované zvířecí protilátky proti lidskému IgM (anti IgM FITC konjugát), montovací roztok, certifikát diagnostické soupravy a návod na použití soupravy (Obr. 21). Dalším potřebným materiálem, který není dodáván se soupravou, je fosfátový pufovaný fyziologický roztok (PBS) na ředění kontrolních sér, testovaných vzorků, konjugátů a promývání sklíček, destilovaná voda na rozpouštění lyofilizovaných složek soupravy, sorbent pro odstranění interference IgM protilátek a revmatoidního

faktoru (Henle *et al.*, 1979), vlhká komůrka (plastová krabička s víkem vyložená navlhčeným savým materiálem) na inkubaci sklíček, zkušavky na ředění vzorků, mikrotitrační destička, kyvety na promývání sklíček, krycí sklíčka a fluorescenční mikroskop.



Obr. 20: Diagnostická souprava IF-VIDITEST k vyšetření anti-EA IgG

Zdroj: autor práce



Obr. 21: Diagnostická souprava IF-VIDITEST k vyšetření anti-VCA IgG a IgM

Zdroj: autor práce

Princip metody:

Pacientské vzorky jsou inkubovány s nátěry buněk na sklíčkách. Pokud vzorek obsahuje protilátky proti daným antigenům na buňkách, naváží se na něj a vytvoří imunokomplex. Tento imunokomplex zviditelníme inkubací se sekundární protilátkou značenou FITC.

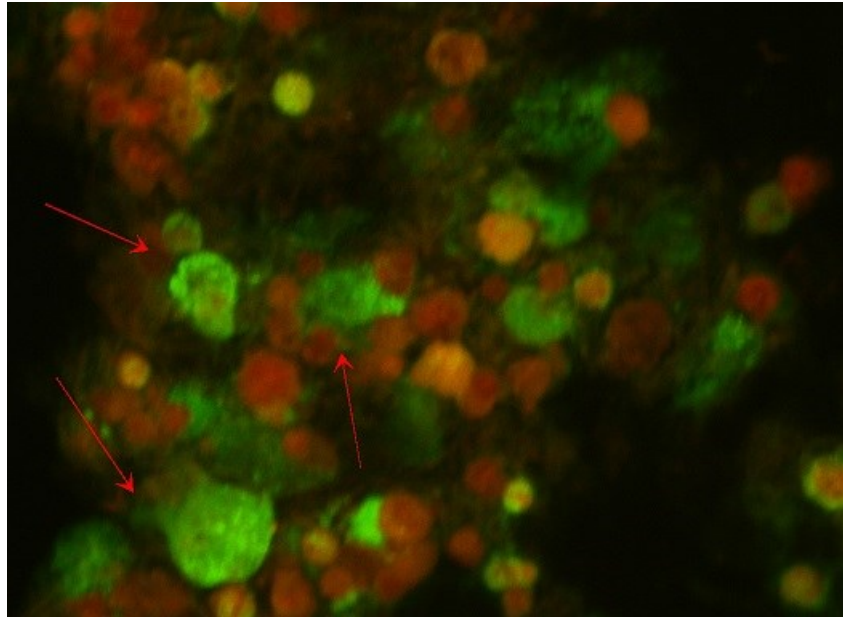
Pracovní postup:

1. Vyndat diagnostickou soupravu a nechat vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Příprava kontrol a reagensů:
Kontrolní séra rozpustit v 0,1 ml destilované vody, přidat 0,9 ml PBS.
IgM konjugát rozpustit v 0,5 ml destilované vody a přidat 4,5 ml PBS.
IgG konjugát rozpustit v 0,25 ml destilované vody a přidat 4,75 ml PBS.
Ředící roztok pro IgM: RF sorbent + PBS v poměru 1:5
3. Příprava testovaných vzorků:
Pro vyšetření IgM protilátek naředit testované vzorky ředícím roztokem pro IgM v poměru 1:20 (95 μ l roztoku + 5 μ l vzorku) a inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
Pro vyšetření IgG protilátek probíhá ředění vzorků a celý test automaticky na přístroji Helmed. Vzorky je třeba připravit do stojánku přístroje Helmed a nastavit na přístroji požadované ředění (podle instrukcí odborného garanta).
4. Na připravená a popsaná IgM sklíčka pipetou aplikovat do jamek 30 μ l naředěných kontrol a naředěné vzorky. Nechat inkubovat 3 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě.
5. Promýt sklíčka 3krát po 5 minutách v kyvetě s PBS, poté opláchnout destilovanou vodou.
6. Pipetovat 30 μ l naředěného konjugátu do každé jamky a nechat inkubovat 1 hodinu ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě.
7. Promýt sklíčka 3krát 10 minut v kyvetě s PBS, a poté opláchnout destilovanou vodou.
8. Po uschnutí sklíček nakapat montovací roztok a aplikovat krycí sklíčko.

Hodnocení testu:

Sklíčka se vyhodnocují pomocí fluorescenčního mikroskopu. Hodnocení je semikvantitativní. Do výsledku se uvádí nejvyšší ředění s pozitivní fluorescencí (Obr. 22) a intenzita fluorescence vyjádřená plusovými znaménky, případně +/- . Pokud je to možné, rozlišují se u protilátek proti EA IgG proti D (Obr. 23) a R složce (Obr. 24). Pokud není přítomna specifická fluorescence (Obr. 25, Obr. 26), výsledek je negativní

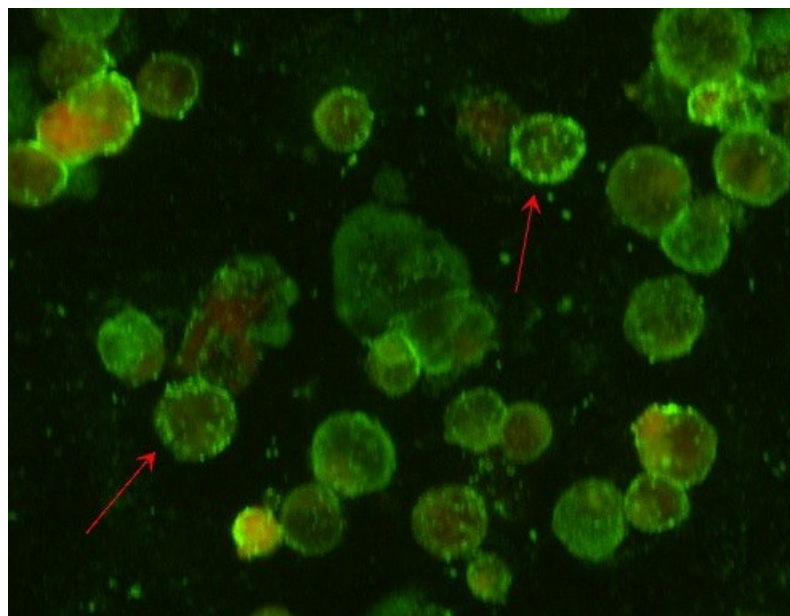
a zapisuje se jako negativní (IgG proti EA) nebo méně než nejnižší použité ředění (IgG a IgM proti VCA).



Obr. 22: Pozitivní imunofluorescence anti-VCA IgG

Zelené zbarvení značí pozitivní fluorescenci navázaných protilátek anti-VCA IgG na lymfomových buňkách infikovaných EBV. Zvětšení 200x.

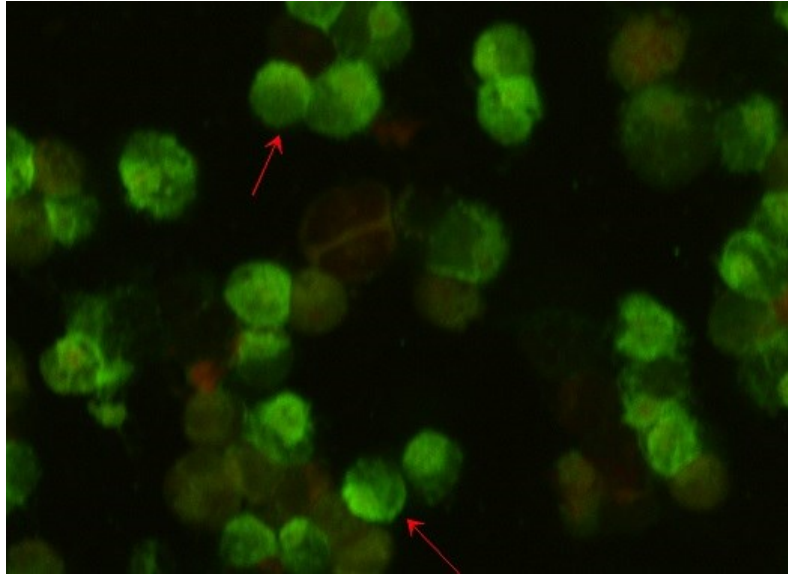
Zdroj: autor práce



Obr. 23: Pozitivní fluorescence anti-EA proti D složce

Zelená barva značí pozitivní fluorescenci. Červené šipky ukazují reprezentativní pozitivní fluorescenci D složky na povrchu Raji buněk. Zvětšení 200x.

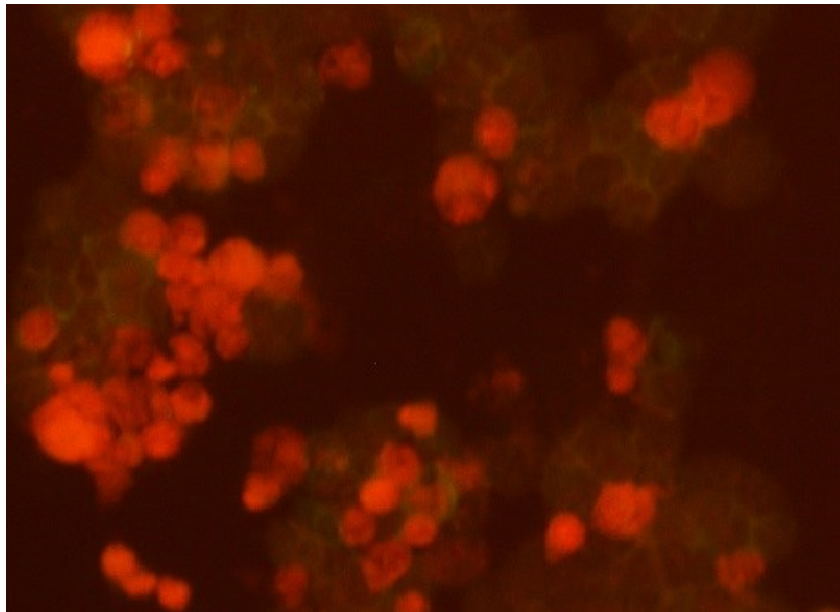
Zdroj: autor práce



Obr. 24: Pozitivní fluorescence anti-EA proti R složce

Zelená barva značí pozitivní fluorescenci. Červené šipky ukazují reprezentativní pozitivní fluorescenci R složky uvnitř Raji buněk, která se projevuje jako agregovaný shluk v cytoplasmě. Zvětšení 200x.

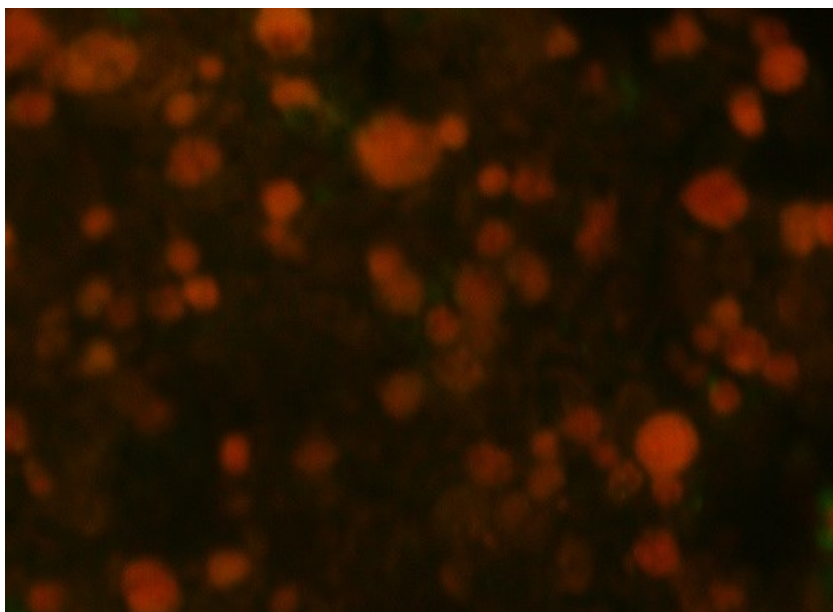
Zdroj: autor práce



Obr. 25: Negativní fluorescence anti-EA

Zde můžeme porovnat, jak vypadají buňky bez pozitivní imunofluorescence. Absence zeleného zbarvení značí nepřítomnost specifických protilátek anti-EA. Zvětšení 200x.

Zdroj: autor práce



Obr. 26: Negativní fluorescence anti-VCA

Absence zeleného zbarvení značí nepřítomnost specifických protilátek anti-VCA. Zvětšení 200x.

Zdroj: autor práce

6.5 Avidita protilátek

Stanovení avidity protilátek se provádí pro rozlišení primární infekce a reaktivace EBV. Po primární infekci se tvoří nízkoavidní protilátky. To znamená, že jejich schopnost vazby s antigenem zatím není tak silná a dá se uvolnit chaotropními činidly např. roztokem močoviny, který se v testu používá. Pokud jsou protilátky vysokoavidní, roztok močoviny vazby neuvolní. Někteří pacienti (většinou imunosuprimovaní) netvoří vysokoavidní protilátky. Index avidity může být navíc ovlivněn krevními převody, podáním gamaglobulinů, imunosupresí, transplantacemi, mateřskými protilátkami. K vyšetření byla použita diagnostickou soupravu od firmy Vidia spol. s r.o.

Pomůcky a reagensie:

Diagnostická souprava obsahuje ELISA odlamovací stripy potažené směsí specifických antigenů, vysokoavidní kontrolní sérum, nízkoavidní kontrolní sérum, negativní kontrolní sérum, protilátky proti lidskému IgG značené peroxidázou (konjugát), koncentrovaný promývací roztok, ředící roztok (diluent), roztok močoviny, chromogensubstrátový roztok a stopovací roztok.

Princip metody:

Metoda je založena na principu ELISA. Na povrchu jamek je navázaný specifický antigen reprezentující imunodominantní epitopy VCA komplexu. Vzorky jsou aplikovány paralelně vedle sebe. Po navázání protilátek z patientského vzorku probíhá v jedné linii jamek inkubace s roztokem močoviny, který naruší případné vazby nízkoavidních protilátek. Na navázané protilátky v dalším kroku nasednou protilátky proti lidskému IgG v konjugátu, které jsou značené křenovou peroxidázou. Chromogensubstrátový roztok reaguje s peroxidázou navázanou na protilátkách za vzniku barevného produktu. Spektrofotometrem se změří absorbance vzniklého zabarvení a software přístroje spočítá relativní index avidity (RAI), tj. poměr mezi absorbancí jamek s roztokem močoviny a jamek s promývacím roztokem vynásobený 100x.

Pracovní postup:

1. Vytemperovat soupravu a vzorky na laboratorní teplotu.
2. Naředit vzorky diluentem 101x (10 µl vzorku + 1000 µl diluent).
3. Připravit pracovní koncentraci promývacího roztoku naředěním 10x v destilované vodě. (50 ml koncentrovaného promývacího roztoku + 450 ml destilované vody).
4. Připravit si destičku s potřebným počtem jamek pro kontroly a vzorky podle schématu (Tab. 6).
5. Pipetovat po 100 µl kontrol a vzorků a inkubovat 30 minut při 37°C.
6. Po skončení inkubace promýt 4x 250 µl promývacího roztoku. Řádně vyklepat zbytek tekutiny.
7. Do lichých stripů pipetovat po 100 µl promývacího roztoku. Do sudých stripů pipetovat 100 µl roztoku močoviny. Inkubovat 10 minut při 37°C.
8. Opakovat bod 6.
9. Pipetovat do všech jamek 100 µl konjugátu a inkubovat 30 minut při 37°C.
10. Opakovat bod 6.
11. Pipetovat do všech jamek po 100 µl chromogensubstrátového roztoku a inkubovat 15 minut v temnu.
12. Pipetovat do všech jamek po 100 µl stopovacího roztoku.

13. Nejpozději do 20 minut změřit destičku na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

Tab. 6: Schéma aplikace kontrol a vzorků pro vyšetření avidity IgG protilátek

	WASH	UREA	WASH	UREA	atd.							
strip č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DIL	DIL	S4	S4								
B	HIGH AVID	HIGH AVID	atd.									
C	LOW AVID	LOW AVID										
D	ST D/CAL	ST D/CAL										
E	ST E/PC	ST E/PC										
F	S1	S1										
G	S2	S2										
H	S3	S3										

Zdroj: Návod k použití soupravy ELISA-VIDITEST anti-VCA EBV IgG a avidita IgG, Vidia spol. s r.o., 2017

Hodnocení testu:

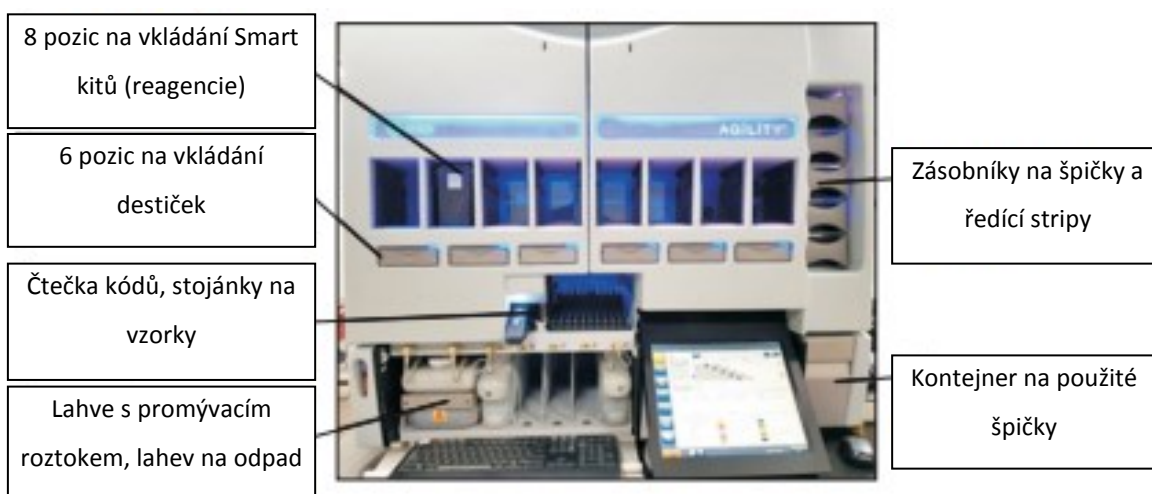
RAI < 30 %: nízkoavidní

RAI 30-50 %: hraniční

RAI > 50 %: vysokoavidní

6.6 Microblot array (MBA)

Vyšetření microblot array je modernější verzí imunoblotu. Místo stripu se využívá jamka mikrotitrační destičky, na jejímž dně je nalepená nitrocelulósová membrána s nanesenými antigeny. K vyšetření využíváme plně automatický analyzátor pro zpracování ELISA souprav Dynex Agility System (Obr. 27) firmy Dynex Technologies Inc. (Buštěhrad, Česká republika), který je pravidelně validován. Soupravy MBA EBV jsou používány od firmy TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.



Obr. 27: Automatický analyzátor Agility

Zdroj: Seok et Shin, 2018 (převzato z:

<https://www.ijmqa.org/journal/view.html?doi=10.15263/ijmqa.2019.41.1.29>)

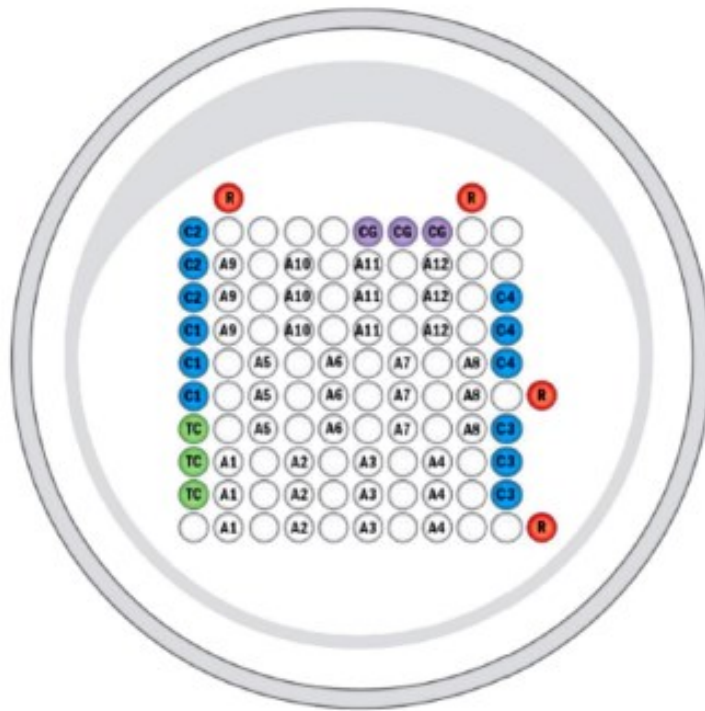
Pomůcky a reagencie:

Diagnostická souprava obsahuje mikrotitrační destičku s nanesenými rekombinantními antigeny, pozitivní kontrolu se specifickými protilátkami, konjugát (zvířecí imunoglobulin značený alkalickou fosfatázou), substrát a univerzální roztok.

Princip metody:

Mikrotitrační destička obsahuje kombinaci vybraných částí specifických antigenů EBV (hlavní skupiny antigenů: EBNA-1, EBNA-2, VCA p18, VCA p23, EA-D p54, EA-D p138,

EA-R, ZEBRA; ostatní antigeny: Rta, gp85, gp350, LMP1) nanesených formou spotů v tripletech na nitrocelulózovou membránu nalepenou na dně jamky (Obr. 28). Přítomné specifické protilátky se navážou na antigeny, následně se označí konjugátem a detekují se barevnou reakcí se substrátovým roztokem.



Popis antigenů

- A1 - EBNA-1
- A2 - EBNA-2
- A3 - VCA p18
- A4 - VCA p23
- A5 - EA-D p54
- A6 - EA-D p138
- A7 - EA-R
- A8 - Rta
- A9 - ZEBRA
- A10 - gp85
- A11 - gp350
- A12 - LMP1

Popis kontrolních spotů

R - Reference
TC - Test control
CG - Conjugate control IgG
C1 - Calibration 1
C2 - Calibration 2
C3 - Calibration 3
C4 - Calibration 4

Obr. 28: Rozložení antigenů a kontrolních spotů v jamce

Zdroj: Návod pro použití Microblot array EBV IgG, Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o.,

2022

Pracovní postup:

1. Vytemperovat soupravu a vzorky na laboratorní teplotu, a poté vložit do analyzátoru.
2. Připravit příslušný počet jamek a vložit do destičky s držákem mikrotitračních destiček.
3. Podle instrukcí přístroje zapnout příslušnou metodu pro příslušné vložené vzorky.
4. Po skončení testu vyjmout reagenční soupravu, zavíčkovat a skladovat podle skladovacích podmínek definovaných výrobcem.
5. Vyjmout destičku a nechat sušit volně na vzduchu po dobu 90 minut nebo na sušícím zařízení 30 až 45 minut.
6. Změření intenzity zbarvení spotů v microblot-array readeru.

Hodnocení testu:

Hodnocení se provádí pomocí MBA readeru a vyhodnocovacího softwaru, který vyhodnotí intenzitu spotů v arbitrárních jednotkách (AU). Pokud je intenzita spotu méně než 6, hodnotí se jako negativní. Pokud je intenzita mezi 6-7, hodnotí se jako hraniční. A pokud je intenzita větší než 7, hodnotí se jako pozitivní. Podle kombinace pozitivních specifických antigenních spotů rozdělených na hlavní a ostatní antigeny je dáno celkové vyhodnocení vyšetření. (Tab. 7) Na základě positivity specifických antigenů pak lze výsledek vyšetření zasadit do klinického kontextu. (Tab. 8)

Tab. 7: Celkové vyhodnocení MBA

	Alespoň jeden ze skupiny Ostatní antigeny: gp350, gp85, Rta, LMP1		
Alespoň jeden Ag z Hlavní skupiny	pozitivní	hraniční	žádná reaktivita
pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
hraniční	pozitivní	hraniční	hraniční
nereaktivní	hraniční	negativní	negativní

Zdroj: Návod pro použití Microblot array EBV IgG, Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o., 2022

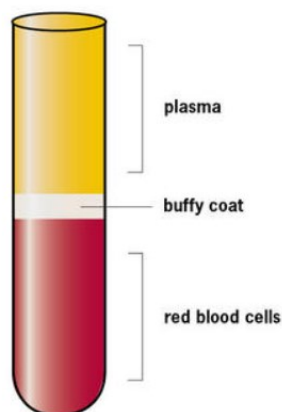
Tab. 8: Interpretace výsledků MBA EBV v klinickém kontextu

Stadium infekce	Typické schéma reaktivity anti-EBV protilátek
Negativní	bez reaktivity ve třídě IgA, IgM i IgG
Primární infekce	IgA: pozitivita anti-VCA, anti-EA-D;
	IgM: pozitivita anti-VCA p18, anti-ZEBRA, anti-EA-D; možná pozitivita anti-VCA p23, anti EBNA-1
	IgG: pozitivita anti-ZEBRA, anti-VCA p23, anti-EA-D, anti-gp350; negativní anti EBNA-1
Postakutní stadium	IgA: možná slabá pozitivita anti-VCA
	IgM: bez reaktivity
	IgG: pozitivita anti-EBNA-1, anti-ZEBRA, anti-VCA p18; možná pozitivita anti-VCA p23, anti-EBNA2, anti-EA-R; slabá reaktivita anti-EA-D
Anamnestické protilátky	IgM: bez reaktivity
	IgG: pozitivita anti-EBNA-1, anti-VCA p18
Reaktivace	IgA: možná pozitivita anti-VCA, anti-EA-D
	IgM: pozitivita anti-VCA, možná slabá pozitivita anti-EA-D, anti-EBNA-1
	IgG: silná pozitivita všech antigenů, možný pokles anti-EBNA-1
Asociace se závažnými formami onemocnění, asociovanými s EBV (NPC, EBV-asociovaný lymfom)	IgA: možná pozitivita anti-VCA, anti-EA-D, anti-gp350, anti-LMP1, anti-Rta, anti-EBNA-1
	IgG: pozitivita anti-LMP1, anti-Rta, anti-ZEBRA, anti-VCA izolované bez anti-EBNA-1

Zdroj: Návod pro použití Microblot array EBV IgG, Test-Line Clinical Diagnostics s.r.o.,
2022

6.7 Detekce EBV DNA pomocí real-time PCR

K detekci DNA viru se používá sérum, plazma, buffy coat (tenká vrstva leukocytů a trombocytů ležící mezi plazmou a erytrocyty po centrifugaci plné krve; Obr. 29), bronchoalveolární laváž (BAL), stěr z krku a mandlí nebo mozkomíšní mok (MM). Pokud se EBV DNA vyšetřuje z plazmy nebo buffy coatu, je nutné krev odebrat do zkumavky s antikoagulační reagenty, která neinhibuje PCR reakci, např. K₃EDTA. Ostatní materiály do sterilních nádob. (GeneProof, 2021)



Obr. 29: Schéma plné krve po centrifugaci

Zdroj: Stanford Blood Centre, 2012

(převzato z: https://stanfordbloodcenter.org/buffy_coats/)

K extrakci a izolaci DNA byla použita souprava croBEE Nucleic Acid Extraction Kit určená k *in vitro* použití v automatu croBEE NA16 NucleicAcid Extraction System Plus (Obr. 30) firmy GeneProof (Brno, Česká republika). K detekci byla použita diagnostická souprava od firmy GeneProof.



Obr. 30: Automatický izolátor croBEE NA16 NucleicAcid Extraction System Plus

(převzato z: <https://zmmm.wl.cm.uj.edu.pl/badania/aparatura>)

Pomůcky a reagensie:

Extrakční kit obsahuje předplněné reagenční kazety, pufr, proteinázu K, carrier RNA (reagensie pro zvýšení výtěžnosti extrakce DNA), pufr pro skladování proteinázy K, vodu bez nukleáz a spotřební materiál (pipetovací špičky, eluční zkumavky, zkumavky na vzorky). Diagnostická souprava obsahuje Master Mix (směs PCR enzymů, cílově specifických primerů a TaqMan sond v pufru), 4 kalibrátory pro kvantitativní analýzu (DNA oligonukleotidy ve 4 koncentracích v pufru) a interní standard (IS, DNA oligonukleotid v pufru).

Princip metody:

Z patientského vzorku je nejdříve extrahována DNA. Následně probíhá amplifikace specifické konzervativní sekvence DNA a detekce nárůstu fluorescence. Cílovou sekvencí amplifikace a detekce je jednokopiový gen kódující nukleární antigen 1 (*EBNA1*). Ke kontrole inhibice PCR a účinnosti extrakce DNA se používá IS, který se přidává přímo ke vzorku na počátku izolačního procesu a prochází tak všemi kroky od extrakce po amplifikaci spolu s patientským vzorkem. Přítomnost EBV DNA je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor FAM (karboxyfluorescein) a IS ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX (hexachlorofluorescein).

Pracovní postup:

- 1) Před zahájením práce vysvítit UV box UV světlem po dobu 15 minut.
- 2) Příprava reagensí k izolaci DNA:
 1. Carrier RNA: do zkumavky s lyofilizovaným Carrier RNA přidat 1 ml vody bez nukleáz a důkladně vortexovat
 2. Proteináza K: do zkumavky s lyofilizovanou proteinázou K přidat 1,1 ml pufru pro skladování proteinázy K a důkladně vortexovat
 3. Rozmrazit požadované množství zkumavek IS, promíchat a krátce centrifugovat.
- 3) Úprava primárních vzorků před izolací:
 1. Podle typu vzorku:
 - a) Plná krev, plazma, sérum, BAL, aspirát, MM, sliny, stěr v transp. médiu:
 - pipetovat 400 µl vzorku do zkumavky na vzorky z extrakčního kitu

b) suchý stěr:

- přidat 1 ml vody bez nukleáz nebo transportního média do primární zkumavky se vzorkem
- vortexovat a centrifugovat
- inkubovat vzorek 15 minut při laboratorní teplotě
- pipetovat 400 μ l vzorku do zkumavky na vzorek z extrakčního kitu

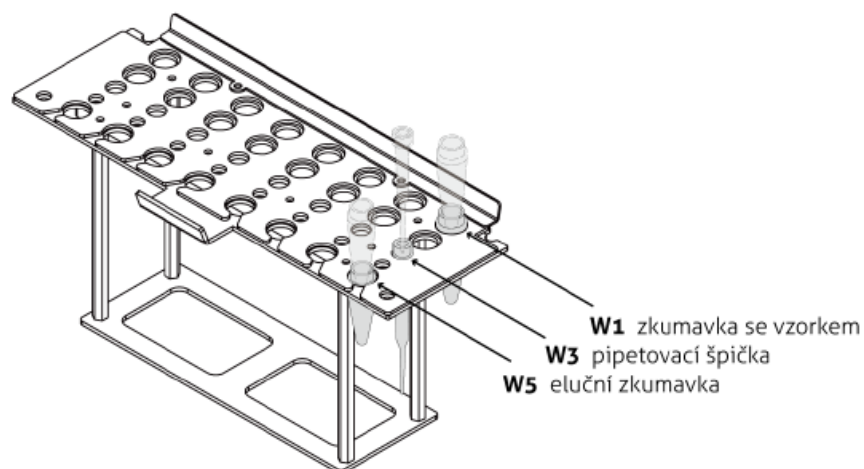
2. Ke vzorku přidat 10 μ l pracovního roztoku Carrier RNA, 20 μ l pracovního roztoku proteinázy K a 10 μ l interního standardu.

4) Příprava přístroje a spuštění izolace:

1. izolační cartridge vložit do nosiče
2. extrakční zkumavku se vzorkem vložit do jamky W1 (Obr. 31)
3. eluční zkumavku vložit do jamky W5
4. jednorázovou plastovou špičku vložit do jamky W3
5. na ovládacím panelu stisknout tlačítko start a zvolit program 201 (extrakce z objemu 400 μ l s elucí 60 μ l)

5) Příprava PCR:

1. jemně vortexovat a krátce centrifugovat komponenty kitu
2. do PCR zkumavek pipetovat 30 μ l Master Mixu a 10 μ l extrahované DNA
3. zkumavky dobře uzavřít, krátce centrifugovat a vložit do real-time PCR přístroje (thermocycler)
4. amplifikovat podle amplifikačního profilu v Tab. 9



Obr. 31: Umístění zkumavek a špiček ve stojánku v přístroji croBEE

Zdroj: Návod k použití croBEE 201A Nucleic Acid Extraction Kit, GeneProof, 2022

Tab. 9: DNA PCR amplifikační profil

Krok	Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů	Fluorescenční kanál
1	Dekontaminace	37	2 min	1	-
2	Počáteční denaturace	95	10 min	1	-
3	Denaturace	95	5 s	45	-
	Annealing	60	40 s		FAM, HEX
	Extenze	72	20 s		-

Zdroj: Návod k použití GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit (GeneProof, 2022),
přepřacováno do tabulky

Hodnocení testu:

Hodnocení testu je kvalitativní. Výsledky z thermocycleru jsou manuálně vyhodnocovány vysokoškolským pracovníkem podle Tab. 10. Při klinické interpretaci je nutné myslet na několik omezení tohoto vyšetření. Jedním z nich je, že určité množství EBV DNA může být detekovatelné i u zdravých jedinců, kteří EBV infekci prodělali, protože EBV přetrvává latentně v paměťových B-lymfocytech. Omezením vyšetření z plné krve je nemožnost rozlišit, kolik EBV DNA je přítomno v mononukleárních buňkách a kolik v plazmě. K rozlišení se dá dodatečně kvantifikovat množství EBV DNA v plazmě. Pozitivní detekce EBV DNA v MM může znamenat spíše kontaminaci B-lymfocyty infikovanými EBV než neuroinfekci způsobenou EBV. (GeneProof, 2021)

Tab. 10: Interpretace výsledků PCR

Kanál FAM (EBV)	Kanál HEX (IS)	Negativní kontrola	Výsledky	Interpretace
+	+	-	Validní	EBV pozitivní
+	-	-	Validní	EBV pozitivní
+	+	+	Nevalidní	Falešně pozitivní/ kontaminace
-	+ (Ct < 38)	-	Validní	EBV negativní
-	+ (Ct > 38)	-	Nevalidní	-
-	-	-	Nevalidní	-

Ct – cycle threshold (prahový počet amplifikačních cyklů)

Zdroj: GeneProof, 2021 (přepřacováno do tabulky)

6.8 Klinická interpretace

Výsledkem vyšetření sérologických markerů je závěr podávající informaci, v jaké fázi onemocnění se pacient přibližně nachází. Zda se jedná o primární infekci EBV, dříve prodělanou infekci nebo pacient infekci neprodělal apod. K přesnému určení diagnózy nestačí pouze výsledky sérologického vyšetření, je nutné znát klinický stav pacienta a případně výsledky dalších vyšetření (biochemické markery, krevní obraz).

Na základě výsledků provedených vyšetření byli pacienti zařazeni do několika skupin podle Tab. 11. První skupinu tvoří pacienti se sérologickým obrazem primární infekce EBV. Tito pacienti mají pozitivní protilátky proti kapsidovému antigenu (VCA) ve třídě IgM i IgG s nízkou aviditou, protilátky proti časnému antigenu (EA) standardně bývají pozitivní, ale mohou být i negativní, negativní nebo hraniční IgG protilátky proti EBNA a případně pozitivní IM test. Druhou skupinou jsou pacienti, kteří prodělali infekci EBV a nevykazují známky aktivní infekce, mají tedy tzv. anamnestické protilátky. Třetí skupinou jsou pacienti, kteří mají zvýšené anamnestické protilátky. Může se jednat o recentně proběhlou nebo počínající reaktivaci.

Do skupiny nejasného obrazu byli zařazeni pacienti, u kterých by byl potřeba další odběr s časovým rozestupem několika týdnů ke sledování dynamiky tvorby protilátek nebo další vyšetření, které nebylo provedeno, protože nebylo indikováno žádajícím lékařem. Tato skupina zahrnuje pacienty s izolovanou pozitivitou anti-VCA IgM protilátek, může se tedy jednat o suspektní primoinfekci nebo nespecifický záchyt IgM protilátek bez EBV etiologie, pacienty s izolovanou pozitivitou anti-EBNA IgG, a dále pacienty se slabou imunitní odpovědí.

Tab. 11: Algoritmus třídění pacientů podle sérologického obrazu

	Anti-VCA		Anti-EA	Anti-EBNA
	IgM	IgG	IgG	IgG
Primární infekce (IM)	+ /++++	- /++++ (LA)	+ /+++	- /+-
Anamnestické protilátky	-	+ /++ (HA)	- /+-	+ /++++
Zvýšené anamnestické protilátky/zvýšené anti-EA IgG	-	+++ / titr 1:160 (HA)	- /+	+ /++++
	-	+ /++ (HA)	+ /+++	+ /++++
Aktivní infekce/reaktivace	+ - /++++	+ /++++ (HA)	+ /+++	+ /++++
Nejasný	Nemá standardní sérologický obraz			

LA – low avidity, HA – high avidity

7. VÝSLEDKY

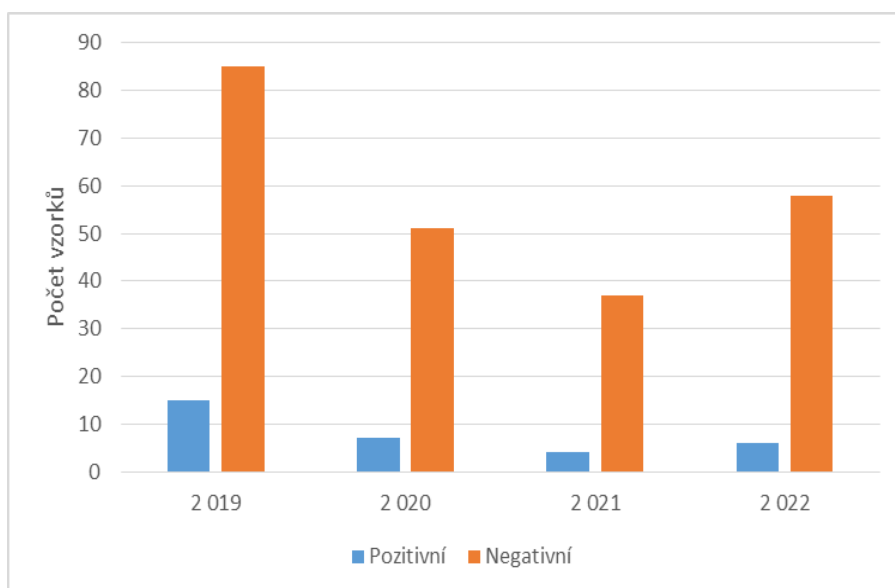
Zpracování výsledků je rozděleno do několika částí podle typu metody. Poslední kapitola se věnuje orientační klinické interpretaci vyšetření pacientů.

7.1 IM test

V laboratoři Vidia-Diagnostika bylo za roky 2019-2022 vyšetřeno tímto testem celkem 263 vzorků. Výsledky v jednotlivých letech ukazuje Tab. 12 a Graf 2.

Tab. 12: Počet a hodnocení vzorků vyšetřených IM testem

Rok	Pozitivní	Negativní	Celkem
2019	15	85	100
2020	7	51	58
2021	4	37	41
2022	6	58	64
Celkový součet	32	231	263



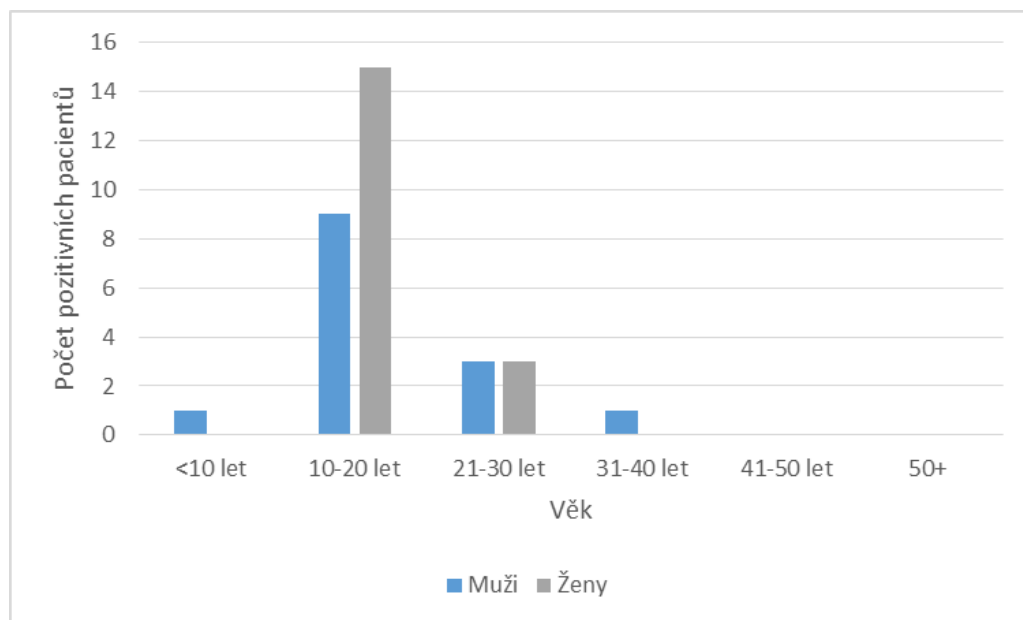
Graf 2: Hodnocení vzorků vyšetřených IM testem

Celkový počet vzorků za roky 2020 a 2021 je výrazně nižší oproti roku 2019. Pravděpodobným vysvětlením je příchod první vlny onemocnění COVID-19 v prvním čtvrtletí roku 2020 a s tím omezení péče praktických lékařů, pediatrů a ORL, kde nejčastěji toto vyšetření indikují.

V Tab. 13 vidíme porovnání výsledků u mužů a žen v jednotlivých dekadách života v rámci celého sledovaného období. Věkové rozmezí testovaných pacientů bylo velmi široké, a to od 2 do 73 let. Nejvíce pozitivních nálezů bylo podle očekávání zachyceno u pacientů ve věku 10-20 let (Graf 3). Věkové rozmezí pozitivních pacientů bylo od 3 do 31 let s nejvyšším počtem pozitivních ve věku 15 a 19 let. Celkový záchyt pozitivních pacientů činil 12 %.

Tab. 13: Četnost sérologických nálezů IM testu podle pohlaví a věku pacientů

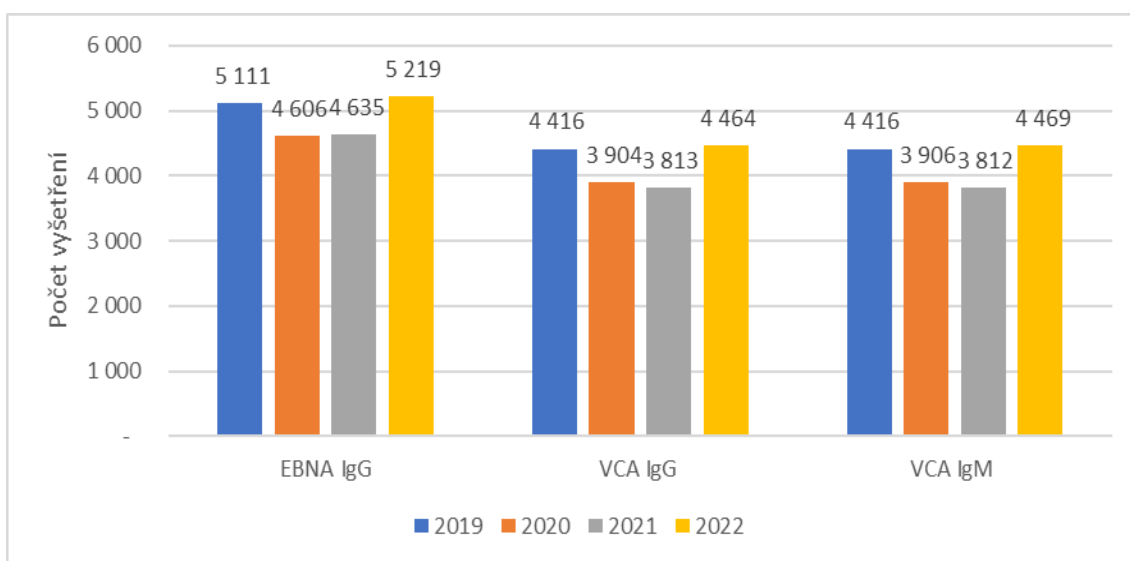
Věk	Muži		Ženy		Celkem	
	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní
<10 let	26	1	25	0	51	1
10-20 let	36	9	52	15	88	24
21-30 let	11	3	20	3	31	6
31-40 let	16	1	17	0	33	1
41-50 let	4	0	5	0	9	0
50+	8	0	11	0	19	0
Celkem	101	14	130	18	231	32



Graf 3: Porovnání pozitivních mužů a žen v jednotlivých věkových kategoriích

7.2 CLIA

Celkem bylo vyšetřeno za všechny čtyři roky 52 771 markerů. Porovnání počtu vyšetřených markerů za jednotlivé roky ukazuje Graf 4. V Tab. 14 vidíme jejich souhrnné vyhodnocení. Počet vyšetření anti-EBNA se liší od počtu vyšetření anti-VCA, protože u některých pacientů byly anti-VCA vyšetřeny metodou nepřímé imunofluorescence místo CLIA, kdežto anti-EBNA byly vyšetřeny pouze metodou CLIA.

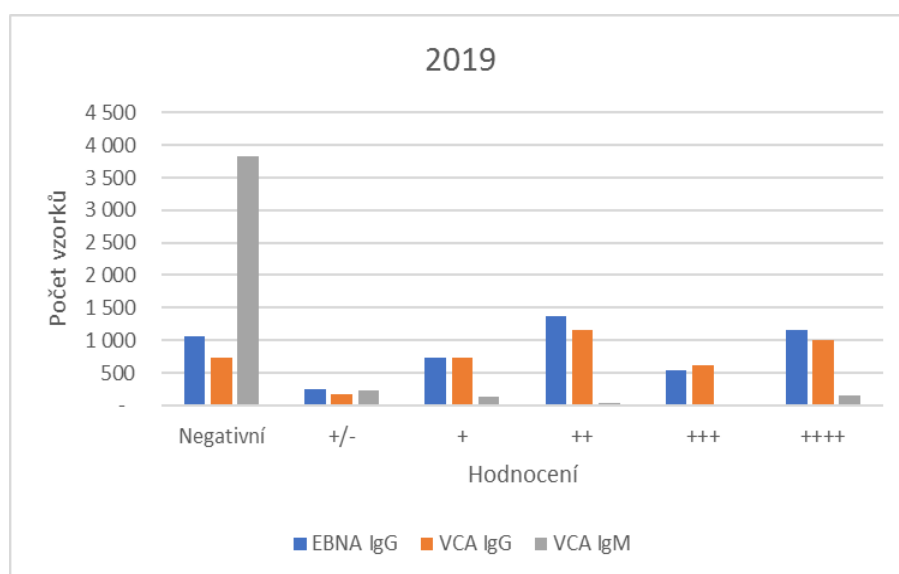


Graf 4: Počet vzorků vyšetřených metodou CLIA

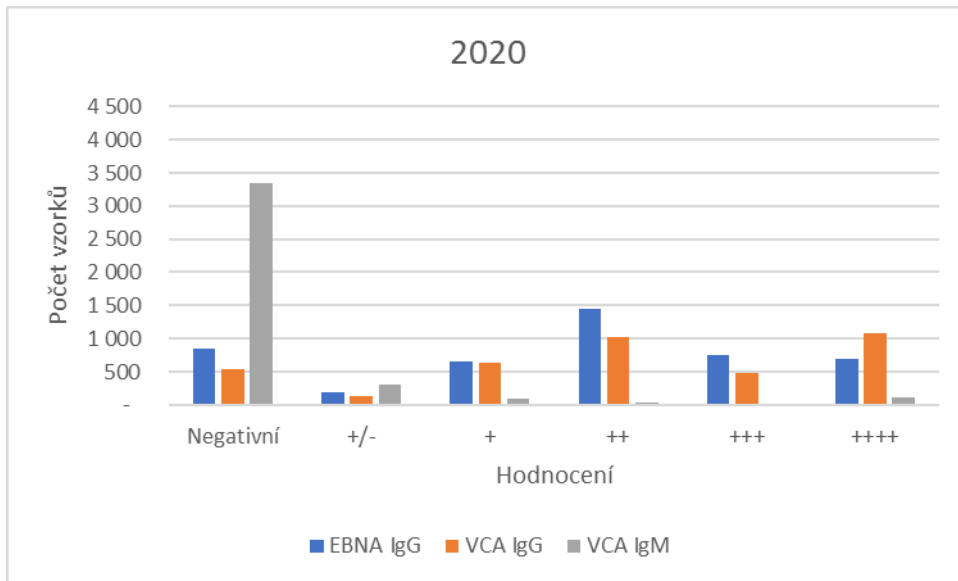
Tab. 14: Vyhodnocení sérologických markerů metodou CLIA

	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
Ab anti EBNA EBV IgG CLIA	5 111	4 606	4 635	5 219	19 571
Negativní	1 063	850	853	1 162	3 928
+/-	253	198	204	210	865
+	731	654	708	807	2 900
++	1 371	1 445	1 539	1 472	5 827
+++	537	759	585	408	2 289
++++	1 156	700	746	1 160	3 762
Ab anti VCA EBV IgG CLIA	4 416	3 904	3 813	4 464	16 597
Negativní	735	544	515	726	2 520
+/-	163	135	136	157	591
+	736	634	625	782	2 777
++	1 160	1 019	971	1 191	4 341
+++	615	485	467	486	2 053
++++	1 007	1 087	1 099	1 122	4 315
Ab anti VCA EBV IgM CLIA	4 416	3 906	3 812	4 469	16 603
Negativní	3 833	3 345	3 318	3 714	14 210
+/-	233	299	232	397	1 161
+	129	103	99	138	469
++	44	34	21	51	150
+++	16	10	12	26	64
++++	161	115	130	143	549
Celkový součet	13 943	12 416	12 260	14 152	52 771

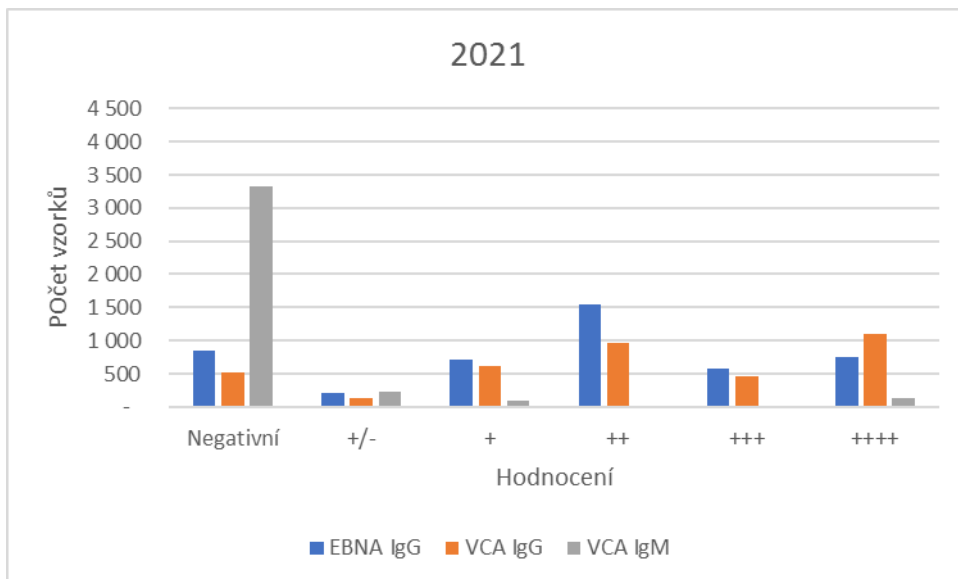
V Grafech 5, 6, 7 a 8 vidíme porovnání hodnocení výsledků za jednotlivé čtyři roky. Grafy vykazují poměrně podobný trend. Počet VCA IgM negativních vzorků výrazně převyšuje všechny ostatní markery.



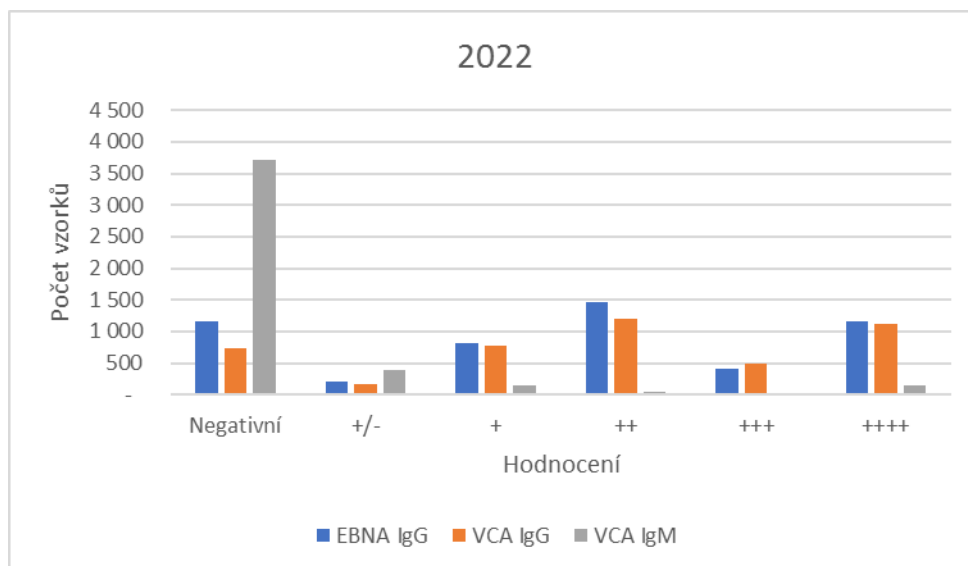
Graf 5: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2019



Graf 6: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2020



Graf 7: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2021



Graf 8: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2022

7.3 NIF

Metodou nepřímé fluorescence bylo vyšetřeno během let 2019-2022 celkem 19 566 vzorků (Tab. 15). Hodnocení imunofluorescence je poměrně subjektivní, pro zjednodušení bylo hodnocení zúženo na negativní, nezvýšené a zvýšené. Nejvíce provedených vyšetření bylo anti-EA IgG, protože byly vyšetřeny pouze imunofluorescencí, kdežto velká část vyšetření anti-VCA byla provedena metodou CLIA. Počet vzorků se zvýšenými anti-EA IgG v roce 2019 (43 %) dosahoval téměř stejného počtu jako počet negativních výsledků (46 %). V dalších letech se poměr vychyloval ve prospěch negativních výsledků (39 % ku 48 % v roce 2020, 36 % ku 51 % v roce 2021, 33 % ku 56 % v roce 2022) (Tab. 16). Zvýšené anti-EA IgG byly nejčastěji proti R-složce (72 % v roce 2019, 74 % v roce 2020, 67 % v roce 2021 a 65 % v roce 2022), v menší míře proti D-složce (17 % v roce 2019, 16 % v roce 2020, 23 % v roce 2021 a 24 % v roce 2022) a nejméně proti D i R-složce zároveň (10-11 %) (Tab. 17). Výsledky vyšetření protilátek anti-VCA shrnují Tab. 18 a 19.

Tab. 15: Počet vyšetření nepřímou imunofluorescencí za jednotlivé roky 2019-2022

	2 019	2 020	2 021	2 022	Celkový součet
Anti-EA EBV IgG	5111	4604	4636	5215	19566
Anti-VCA EBV IgG	916	870	922	904	3612
Anti-VCA EBV IgM	916	870	922	904	3612

Tab. 16: Hodnocení vyšetření anti-EA IgG za jednotlivé roky 2019-2022

	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
Negativní	2365	2189	2387	2936	9877
+/-	534	623	602	561	2320
zvýšené (+ a více)	2212	1792	1647	1718	7369

Tab. 17: Diferenciace zvýšených protilátek anti-EA IgG

	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
zvýšené pouze proti D	369	279	355	384	1387
zvýšené pouze proti R	1545	1284	1045	1062	4936
Zvýšené proti R i D	231	181	153	186	751

D-difúzní složka časného antigenu, R-restricted složka časného antigenu

Tab. 18: Výsledky vyšetření anti-VCA IgM metodou NIF

	2 019	2 020	2 021	2 022	Celkový součet
Negativní (<1:20)	567	544	627	723	2461
Pozitivní (> 1:20)	348	326	294	181	1149

Tab. 19: Výsledky vyšetření anti-VCA IgG metodou NIF

	2 019	2 020	2 021	2 022	Celkový součet
negativní (<1:10)	31	31	33	49	144
nezvýšené (1:10 až 1:160 +/-)	126	138	196	185	645
zvýšené (1:160 až 1:640)	467	519	524	533	2043
výrazně zvýšené (> 1:640)	292	182	169	137	780

7.4 Avidita

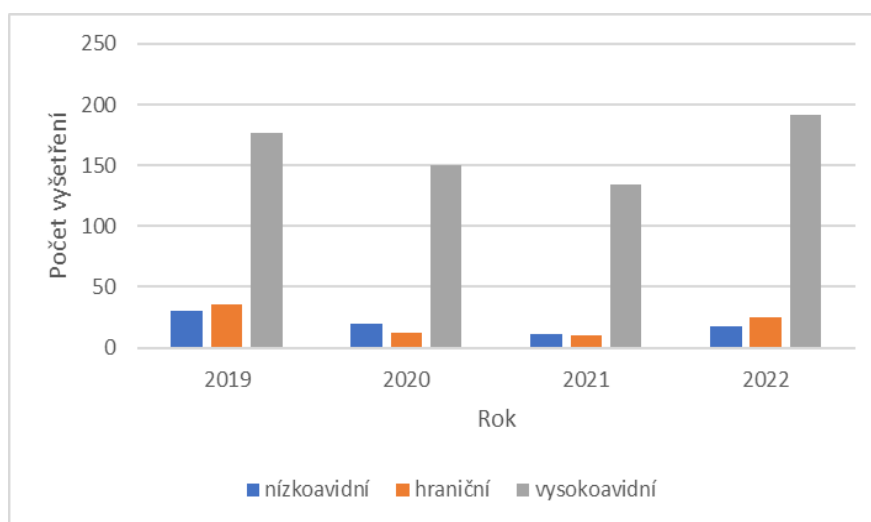
Za roky 2019-2022 bylo provedeno celkem 815 vyšetření avidity protilátek. Nejvíce vyšetření bylo provedeno v roce 2019 (243). Během covidové pandemie v roce 2020 a 2021 počet vyšetření klesl. V roce 2022 se počet vyšetření blíží k počtu vyšetření v roce 2019. Ve všech letech převažují počty vyšetřovaných žen oproti počtu vyšetřovaných mužů (Tab. 20). Výsledky vyšetření avidity protilátek v jednotlivých letech 2019-2022 zobrazuje Tab. 21. V Grafu 9 pak lze vidět grafické porovnání výsledků mezi jednotlivými roky.

Tab. 20: Počet vyšetření podle pohlaví v jednotlivých letech 2019-2022

Pohlaví	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
Muž	94	62	67	109	332
Žena	149	120	88	126	483
Celkový součet	243	182	155	235	815

Tab. 21: Výsledky vyšetření avidity za roky 2019-2022

Výsledek	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
nízkoavidní	30	20	11	18	79
hraniční	36	12	10	25	83
vysokoavidní	177	150	134	192	653

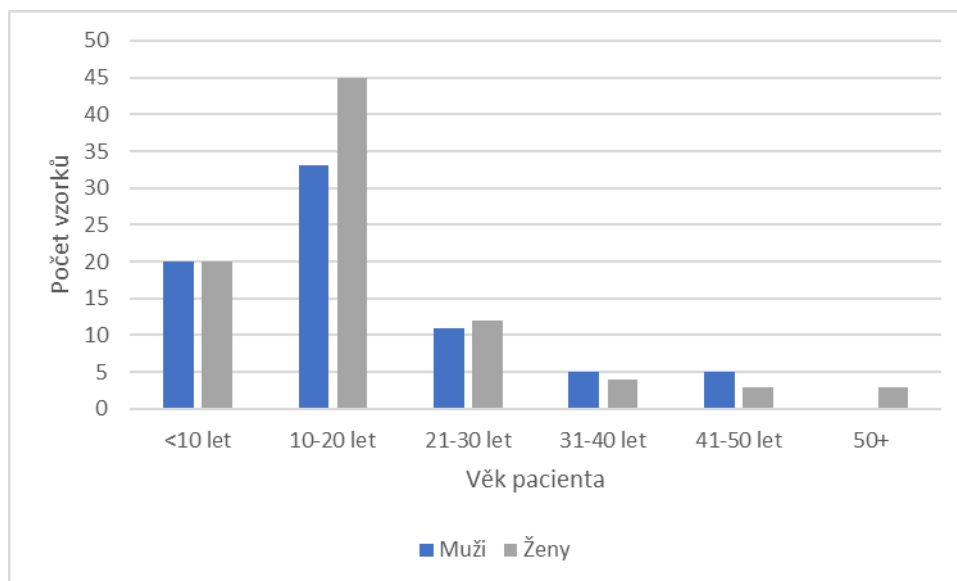


Graf 9: Porovnání výsledků avidity za roky 2019-2022

Nízkoavidní nebo hraniční výsledek značí probíhající nebo recentně proběhlou primární infekci. Podle očekávání je nejvíce nízkoavidních nebo hraničních výsledků u pacientů ve věku 10-20 let. (Tab. 22, Graf 10)

Tab. 22: Četnost nízkoavidních a hraničních výsledků avidity dle věku a pohlaví pacienta

	Muži	Ženy	Celkem
<10 let	20	20	40
10-20 let	33	45	78
21-30 let	11	12	23
31-40 let	5	4	9
41-50 let	5	3	8
50+	0	3	3
Celkem	74	87	161



Graf 10: Porovnání nízkoavidních a hraničních výsledků podle pohlaví a věku pacienta

7.5 MBA

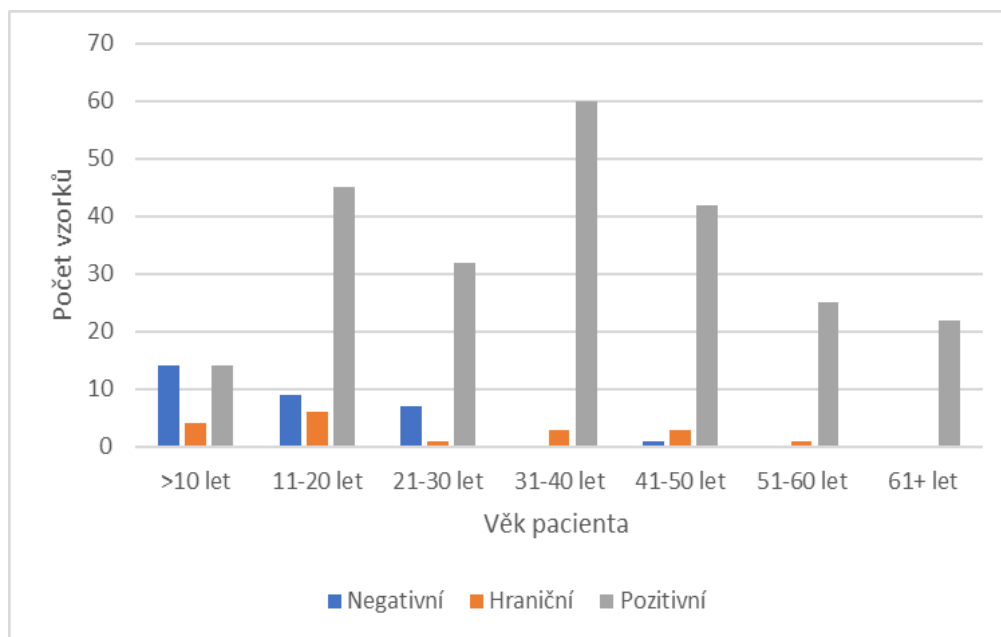
Metoda microblot array byla zavedena v průběhu roku 2021. V roce 2022 bylo vyšetřeno 289 vzorků z toho 240 bylo pozitivních, 18 hraničních a 31 negativních (Tab. 23). Věkové rozmezí pacientů bylo od 2 do 79 let. Nejvíce negativních výsledků bylo u pacientů mladších 10 let (Tab. 24). Podle očekávání počet negativních výsledků rapidně klesá se zvyšujícím se věkem pacienta a zvyšuje se podíl pozitivních výsledků (Graf 11).

Tab. 23: Hodnocení vyšetření MBA za rok 2022

Hodnocení	Počet vzorků
Negativní	31
Hraniční	18
Pozitivní	240
Celkový součet	289

Tab. 24: Hodnocení vyšetření MBA za rok 2022 podle věku pacienta

	Negativní	Hraniční	Pozitivní	Celkem
>10 let	14	4	14	32
11-20 let	9	6	45	60
21-30 let	7	1	32	40
31-40 let	0	3	60	63
41-50 let	1	3	42	46
51-60 let	0	1	25	26
61+ let	0	0	22	22



Graf 11: Výsledky MBA podle věku pacienta

7.6 PCR

Během čtyř sledovaných let bylo vyšetřeno EBV DNA ve 42 vzorcích (Tab. 25). Vyšetření bylo provedeno z různých typů materiálu. EBV DNA byla detekována pouze u bronchoalveolární laváže (BAL), buffy coatu a séra (Tab. 26). Celkový záchyt EBV DNA tvořil 0 % v roce 2019 (žádné pozitivní vzorky), 27 % v roce 2020, stejně tak i v roce 2021 a v roce 2022 18 %. Věk testovaných pacientů se pohyboval od 0 do 70 let. Věk pacientů s pozitivním záchytem byl 10 až 69 let. Nejvíce testovaných bylo ve věku 10-19 let (Tab. 27). Nejvíce pozitivních výsledků bylo u pacientů ve věku 30-39 let (Tab. 28).

Tab. 25: Počet vyšetření EBV DNA za roky 2019-2022

Rok	Negativní	Slabě pozit.	Pozitivní	Celkem
2019	9			9
2020	8		3	11
2021	8	2	1	11
2022	9		2	11
Celkem	35	2	6	42

Tab. 26: Výsledky vyšetření EBV DNA podle typu materiálu

Typ vzorku	Negativní	Slabě pozit.	Pozitivní	Celkem
BAL		1		1
buffy coat	21	1	2	24
plasma	2			2
stěr	4			4
sérum	7		4	11
Celkem	35	2	6	42

Tab. 27: Počet pacientů vyšetřených PCR podle věku a pohlaví

věk	Muž	Žena	Celkem
10-19 let	9	5	14
20-29 let	3	2	5
30-39 let	3	6	9
40-49 let	2	3	5
50-59 let	1	1	2
60-69 let	1	6	7
>70 let	0	1	1

Tab. 28: Počet EBV DNA pozitivních pacientů podle věku a pohlaví

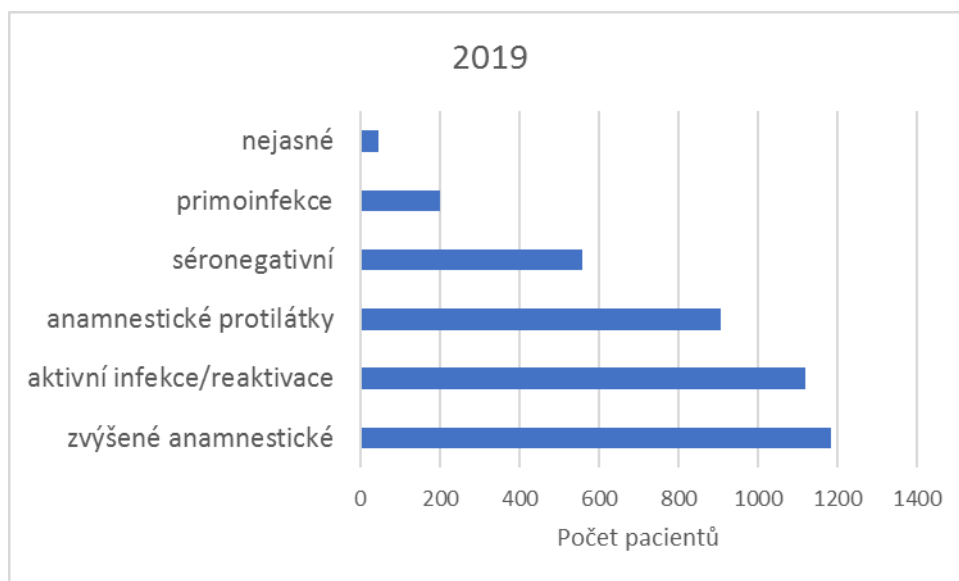
věk	Muž	Žena	Celkem
10-19 let	2	0	2
20-29 let	0	1	1
30-39 let	1	2	3
>40 let	0	2	2

7.7 Klinická interpretace

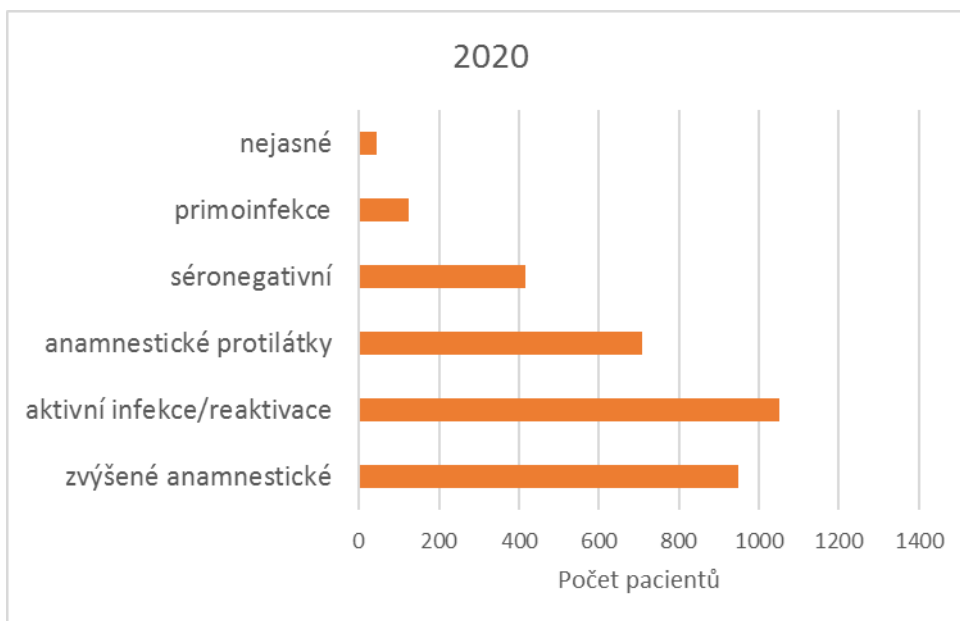
Do klinické interpretace bylo zahrnuto celkem 14 736 pacientů vyšetřených v letech 2019-2022. Četnost jednotlivých stádií EBV infekce s procentuálním podílem v daném roce ukazuje Tab. 29. Pacienti vyšetření pouze IM testem nebo PCR bez vyšetření specifických protilátek nebyli zahrnuti do statistického hodnocení. V grafu 12, 13, 14 a 15 je znázorněno porovnání jednotlivých stádií EBV infekce mezi roky 2019-2022 v testovaném souboru pacientů.

Tab. 29: Četnost jednotlivých stádií EBV infekce za roky 2019-2022

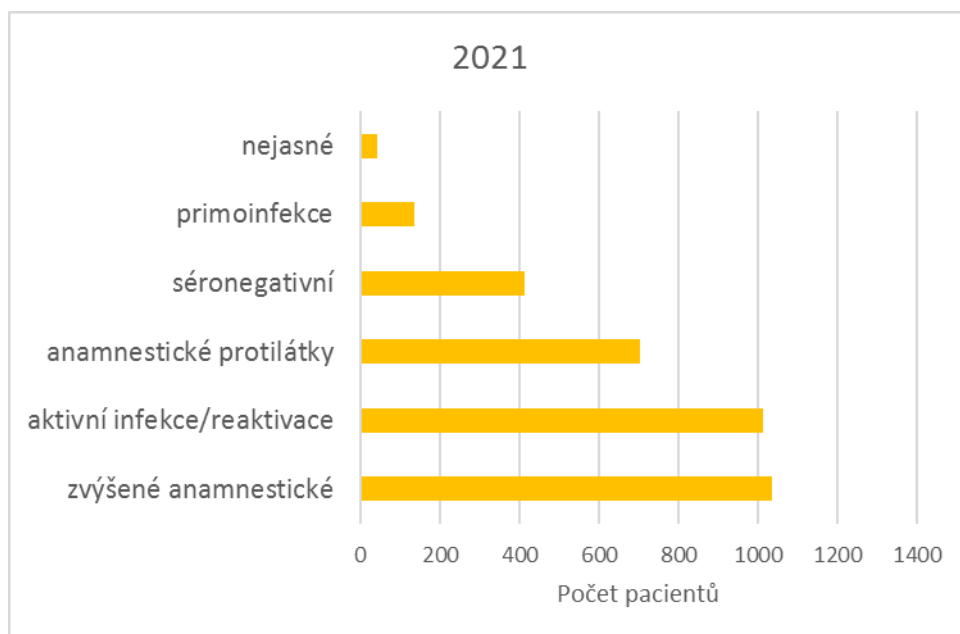
Stádium	2019	2020	2021	2022	Celkem
zvýšené anamnestické	1185 (29,52 %)	948 (28,78 %)	1036 (31,02 %)	1294 (31,65 %)	4463 (30,29 %)
aktivní infekce/reaktivace	1120 (27,90 %)	1051 (31,91 %)	1013 (30,33 %)	1004 (24,56 %)	4188 (28,42 %)
anamnestické protilátky	907 (22,60 %)	709 (21,52 %)	703 (21,05 %)	988 (24,17 %)	3307 (22,44 %)
séronegativní	557 (13,88 %)	418 (12,69 %)	414 (12,40 %)	572 (13,99 %)	1961 (13,31 %)
primoinfekce	201 (5,01 %)	125 (3,79 %)	134 (4,01 %)	171 (4,18 %)	631 (4,28 %)
nejasné	44 (1,10 %)	43 (1,31 %)	40 (1,20 %)	59 (1,44 %)	186 (1,26 %)
Celkem	4014	3294	3340	4088	14736



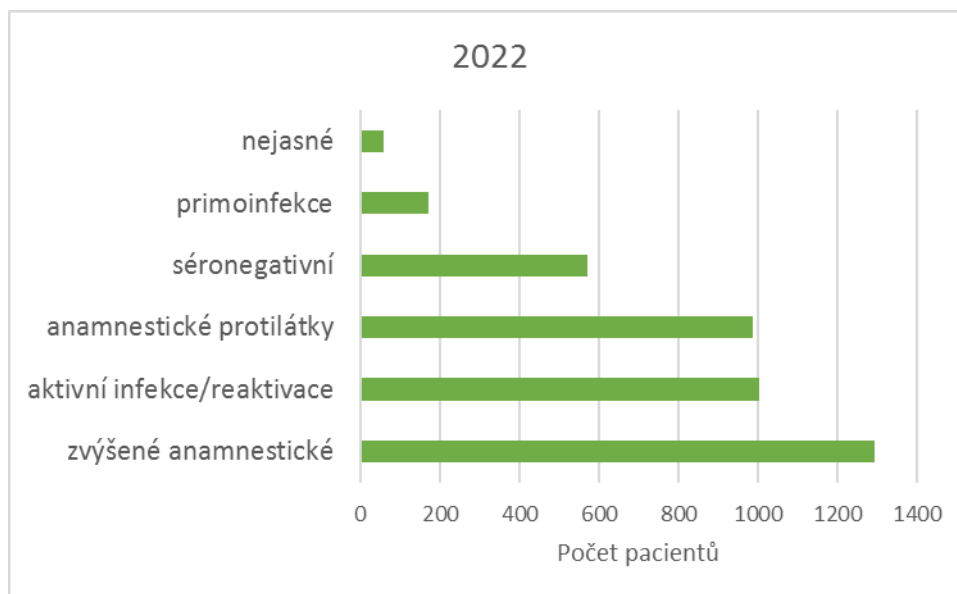
Graf 12: Četnost jednotlivých stádií v roce 2019



Graf 13: Četnost jednotlivých stádií v roce 2020



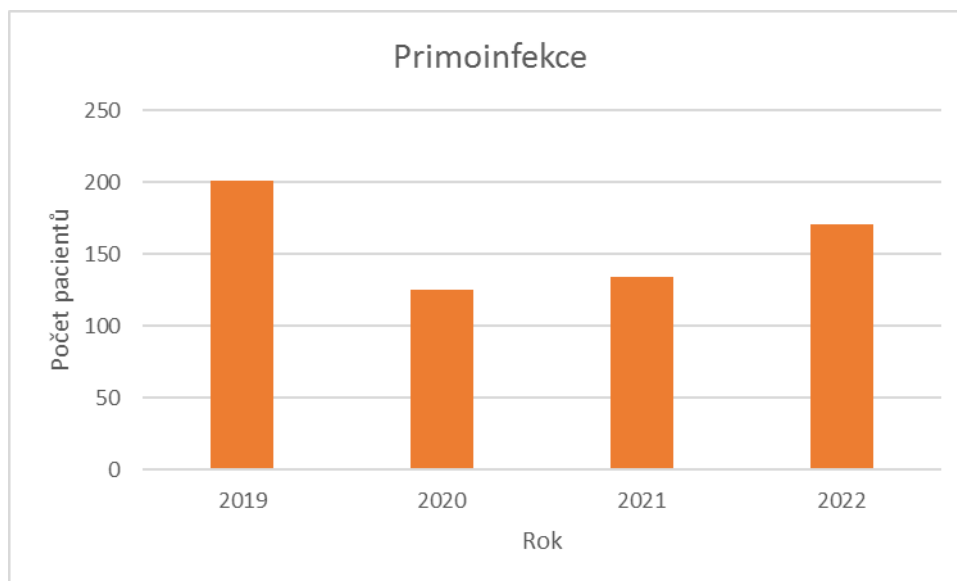
Graf 14: Četnost jednotlivých stádií v roce 2021



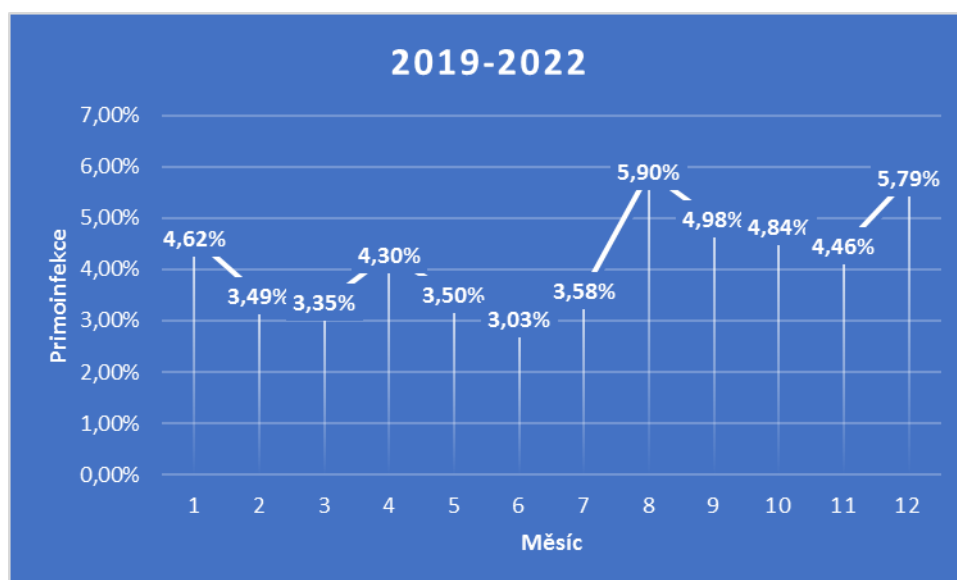
Graf 15: Četnost jednotlivých stádií v roce 2022

7.7.1 Incidence primoinfekce v letech 2019-2022

Záchyt primoinfekce EBV činil 4,28 % z celkového počtu 14 736 pacientů. V Graf 16 je znázorněno porovnání počtu případů v jednotlivých letech sledovaného období. Graf 17 zobrazuje průběh procentuálního záchytu primoinfekcí EBV z celkového počtu testovaných v daném měsíci během všech čtyř let. Z grafu je patrný vyšší záchyt primoinfekcí EBV v srpnu a v prosinci, který je téměř dvojnásobný oproti červnu. Věkové rozmezí pacientů s obrazem primární infekce EBV bylo 1-44 let. Největší počet pacientů s primoinfekcí byl pozorován ve věku 15-19 let (Tab. 30) s celkovým maximem v 17 letech (Tab. 31) Porovnání incidence mezi danými věkovými kategoriemi v jednotlivých letech zobrazují Graf 18, 19, 20 a 21.



Graf 16: Četnost primoinfekcí EBV v jednotlivých letech 2019-2022



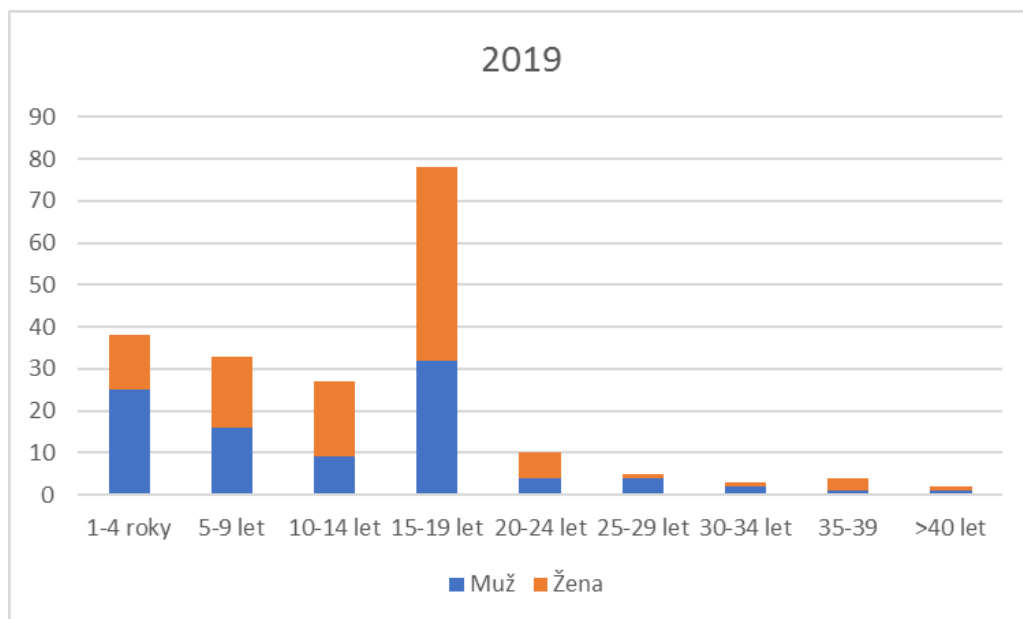
Graf 17: Procentuální záchyt primoinfekcí EBV v jednotlivých měsících za roky 2019-2022

Tab. 30: Četnost primoinfekce EBV podle věkových kategorií

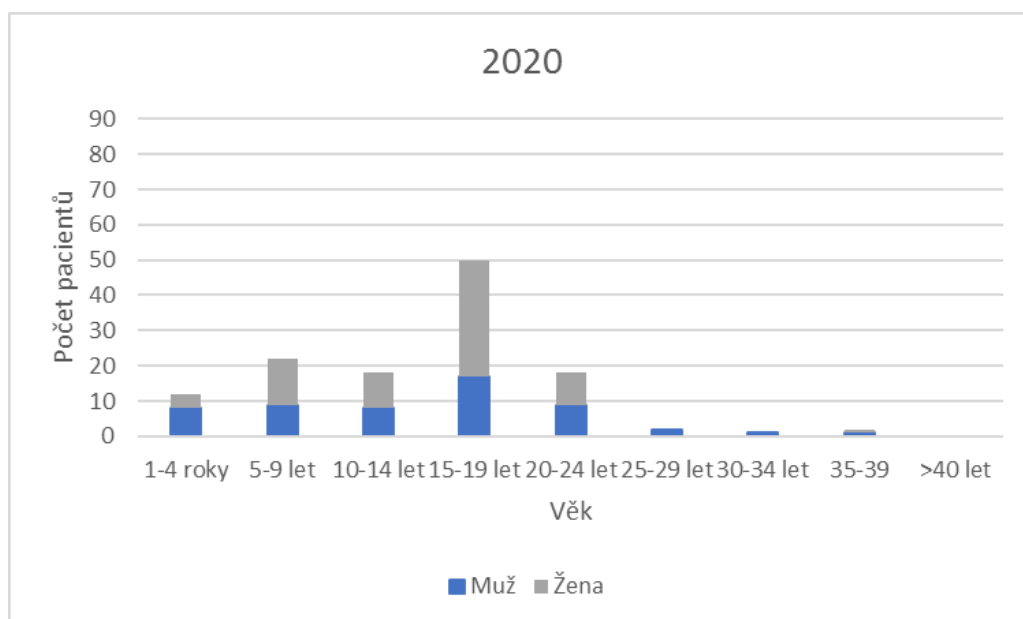
Věk	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
1-4 roky	38	12	20	21	91
5-9 let	33	22	19	25	99
10-14 let	27	18	22	41	108
15-19 let	78	50	45	56	229
20-24 let	10	18	16	16	60
25-29 let	5	2	5	6	18
30-34 let	3	1	2	3	9
35-39	4	2	3	2	11
>40 let	2	0	1	1	4

Tab. 31: Četnost primoinfekce u pacientů mezi 15. a 19. rokem života

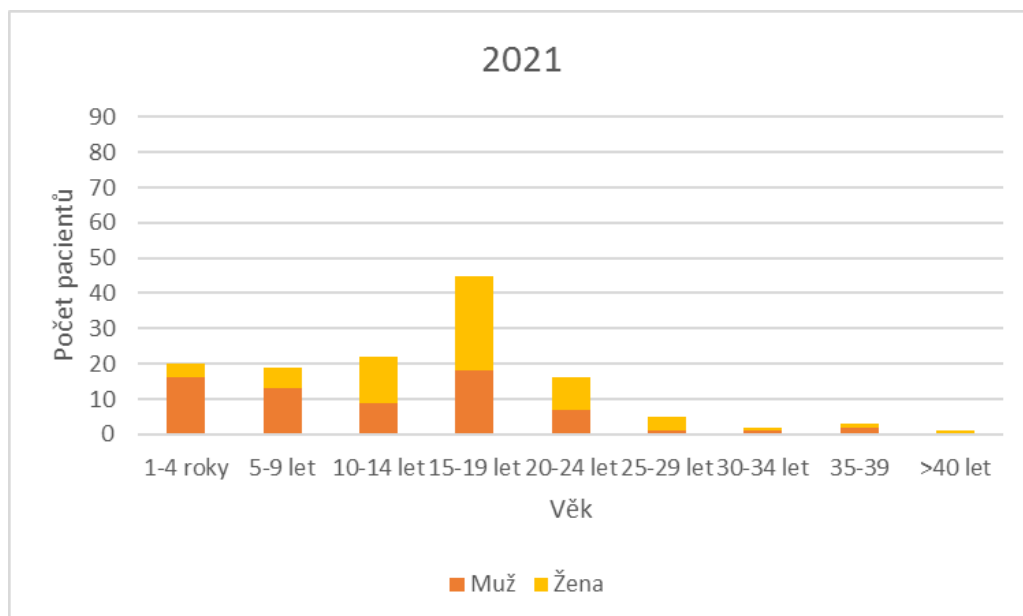
Věk	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
15 let	18	9	6	8	41
16 let	15	12	7	18	52
17 let	15	14	16	16	61
18 let	17	9	6	9	41
19 let	13	6	10	5	34



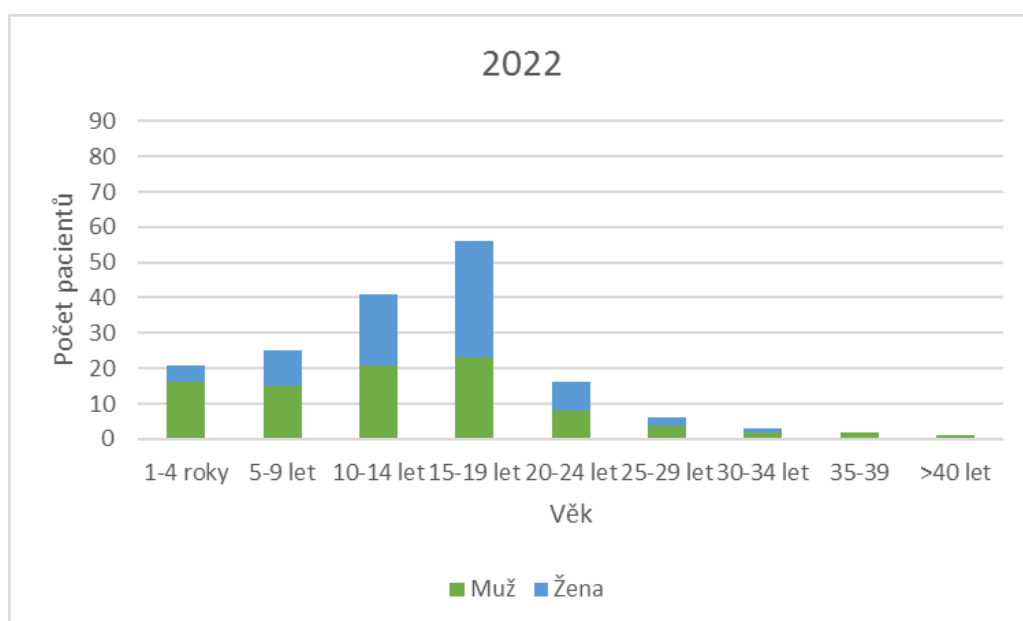
Graf 18: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2019



Graf 19: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2020



Graf 20: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2021



Graf 21: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2022

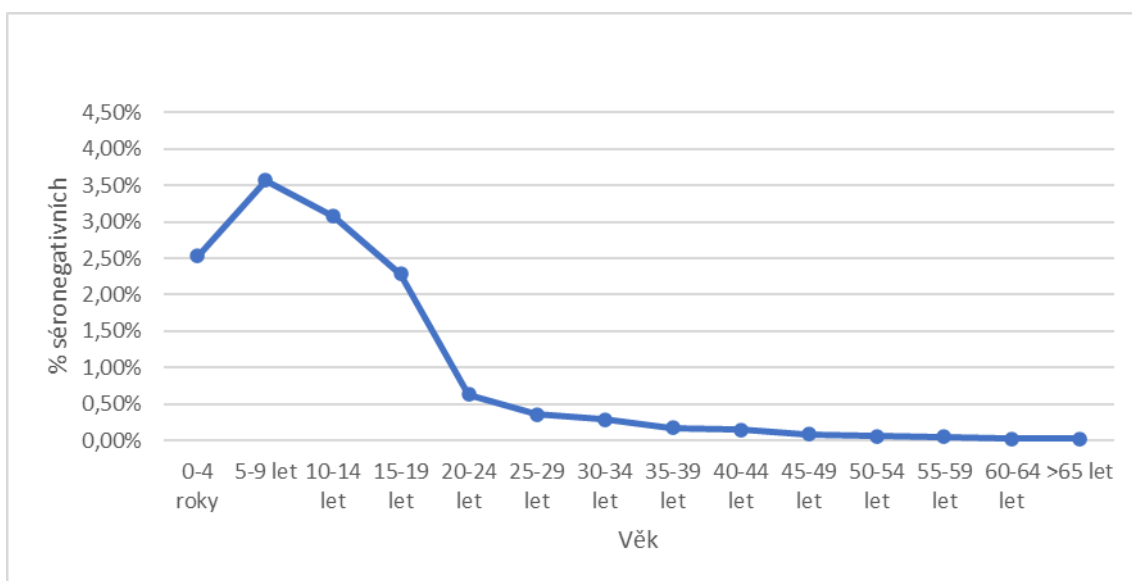
7.7.2 Séroprevalence testovaného souboru pacientů

Z celkového počtu 14 736 pacientů zahrnutých do hodnocení nebyly detekovány žádné pozitivní protilátky proti EBV u 1961 z nich. To odpovídá celkově 13,31 % séronegativních pacientů v testovaném souboru, z toho 11,46 % bylo mladších 20 let (Tab. 32). Celkový podíl séronegativních pacientů z celkového počtu testovaných

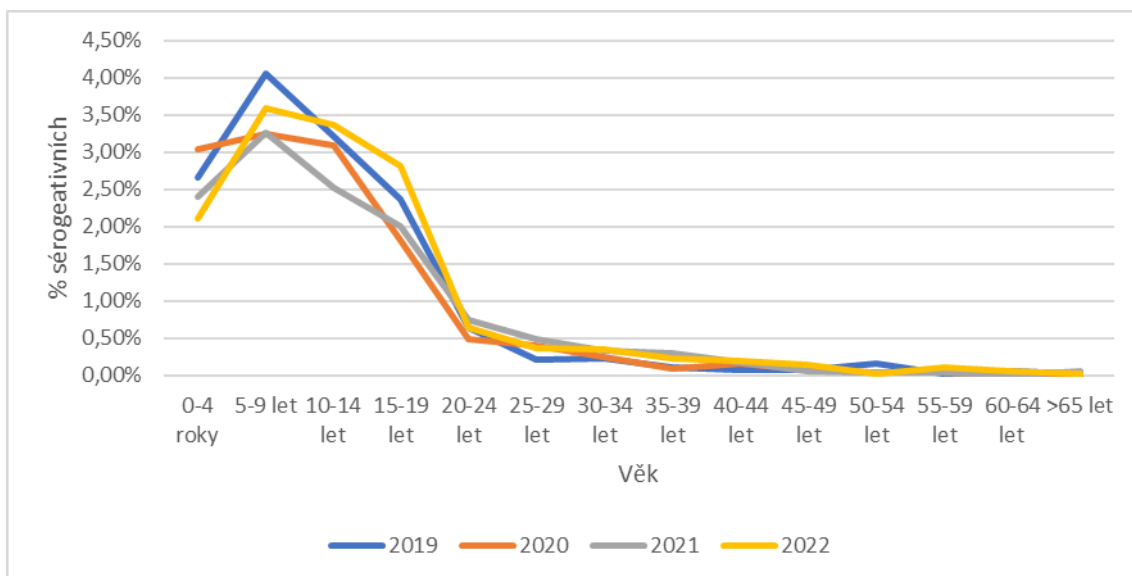
rapidně klesá se zvyšujícím se věkem pacientů (Graf 22). Jednotlivé roky sledovaného období ukazují stejný trend (Graf 23).

Tab. 32: Četnost séronegativních pacientů podle věku

Věk	2019	2020	2021	2022	Celkový součet
0-4 roky	107	100	80	86	373 (2,53 %)
5-9 let	163	107	109	147	526 (3,57 %)
10-14 let	129	102	84	138	453 (3,07 %)
15-19 let	95	60	67	115	337 (2,29 %)
20-24 let	26	16	25	26	93 (0,63 %)
25-29 let	8	13	16	15	52 (0,35 %)
30-34 let	9	8	11	14	42 (0,29 %)
35-39 let	4	3	10	9	26 (0,18 %)
40-44 let	3	5	6	8	22 (0,15 %)
45-49 let	3	2	2	6	13 (0,09 %)
50-54 let	6	1	1	1	9 (0,06 %)
55-59 let	1	1	1	4	7 (0,05 %)
60-64 let	2	0	0	2	4 (0,03 %)
>65 let	1	0	2	1	4 (0,03 %)



Graf 22: Procentuální podíl všech séronegativních pacientů podle věku



Graf 23: Procentuální podíl séronegativních pacientů podle věku v jednotlivých letech 2019-2022

8. DISKUSE

Virus Epstein-Barr je kosmopolitně rozšířeným patogenem. Po prodělání primární infekce nastává celoživotní nosičství viru s možností reaktivace viru kdykoli během života. Tato vlastnost EBV s sebou nese i možnost vzniku lymfoproliferativního onemocnění, které v našich podmínkách nebývá naštěstí moc časté, avšak určité skupiny obyvatelstva jsou ohroženy více než ostatní. Virus se přenáší hlavně slinami, proto je infekční mononukleóza známá jako tzv. „nemoc z líbání“ nebo „nemoc studentů“.

Za roky 2019-2022 bylo v laboratoři infekční sérologie a virologie společnosti Vidia-Diagnostika otestováno 14 736 pacientů na přítomnost specifických protilátek proti EBV. 263 pacientů na přítomnost heterofilních protilátek a 42 pacientů na přítomnost EBV DNA. Virově specifické protilátky byly měřeny pomocí chemiluminiscenční imunoanalýzy a nepřímé imunofluorescence na sklíčkách. Jako doplňkové metody pomáhající k přesnější interpretaci byly využity stanovení avidity protilátek anti-VCA IgG a metoda microblot array. Stanovení EBV DNA se provádí velmi okrajově, zejména u pacientů s těžším průběhem infekce, vážnějšími komorbiditami nebo u imunosuprimovaných pacientů, proto byl počet vzorků v testovaném souboru nízký. Chemiluminiscenční imunoanalýza je moderní metoda umožňující rychlou a dostatečně citlivou detekci protilátek. Vzhledem k různému složení používaných antigenů v CLIA a NIF metodách se mohou výsledky obou vyšetření lišit. Stanovení protilátek pomocí imunofluorescence je považováno za tzv. zlatý standard diagnostiky EBV. Tato metoda bývá proto využívána i jako metoda referenční. (Gärtner *et al.*, 2001; Corrales *et al.*, 2014) Metoda microblot array je moderním zástupcem imunoblottingu. Pomáhá detekovat protilátky proti jednotlivým komponentám antigenů, a tím přesněji určit fázi onemocnění.

Interpretace sérologického nálezu není vždy jednoznačná a jednoduchá. V dnešní době je již k dispozici velké portfolio metod, které pomáhají upřesnit diagnózu. Každý pacient je ale jiný a reaguje jinak. Na to je potřeba myslet obzvlášť při interpretaci nepřímých laboratorních metod, jako je průkaz protilátek proti infekčním agens.

Podle Kleinerové (2005) má infekční mononukleóza spíše sezónní výskyt, naproti tomu Beneš (2009) tvrdí, že výskyt nemoci bývá zaznamenáván během celého roku a nevykazuje sezónní charakter. EBV není vázán na živý vektor, který by v našich podnebných podmínkách způsoboval výrazný sezónní výskyt, jako vykazuje například virus klíšťové meningoencefalitidy. Zaznamenali jsme však nejvyšší výskyt v srpnu a v prosinci (5,90 % a 5,79 % primoinfekcí EBV z počtu všech testovaných v daném měsíci). Celorepubliková data o počtu hlášených případů IM sezónní trend nepotvrzují. (ÚZIS ČR, 2013)

Ve vyspělých zemích je pozorován zvyšující se průměrný věk populace, při kterém dochází k primoinfekci EBV. Vyšší věk je spojen s horším průběhem infekční mononukleózy a vyšším rizikem hospitalizace. (Morris *et al.*, 2002; Tattevin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013; Hocqueloux *et al.*, 2015; Fourcade *et al.*, 2017) Fourcade *et al.* (2017) zaznamenali v letech 2000-2016 nejvíce primoinfekcí EBV ve stejné věkové kategorii. Oproti tomu Cui *et al.* (2018) zachytili v čínské populaci nejvyšší výskyt primoinfekce EBV u dětí do 5 let věku. Nejvíce primoinfekcí v testovaném souboru pacientů z laboratoře Vidia-Diagnostika bylo podle očekávání zachyceno u pacientů ve věku 15-19 let. Toto zjištění koresponduje i s daty o výskytu hlášených případů IM z Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR z roku 2013. (ÚZIS ČR, 2013)

Významné množství autorů uvádí více než 90% promořenost populace. Séropozitivita EBV v Pekingu v období 2013-2017 dosahovala v některých věkových skupinách až 99 %. (Cui *et al.*, 2018) Studie z Francie zaznamenala za období 2000-2015 séropozitivitu EBV u 88 % případů z testované populace s dlouhodobým klesajícím trendem v průběhu let. V populaci nad 20 let věku zaznamenali pouze 2,1 %, 2,5 % a 3,1 % séronegativních pacientů za období 2001-2005, 2006-2010 a 2011-2015. (Fourcade *et al.*, 2017) Promořenost testovaného souboru laboratoře Vidia-Diagnostika byla 86,7 %, což bylo méně, než se čekalo. Většinu nepromořené populace testovaného souboru tvořili pacienti do 20 let (11,5 %). Promořenost nad 20 let věku pacienta činila 98,2 %. Séronegativita testovaného vzorku pacientů tak činila pouze 1,81 %. Tedy překvapivě ještě méně než studie, kterou provedli Fourcade *et al.*

V porovnání s ostatními roky bylo v roce 2020 pozorováno v naší laboratoři zvýšení podílu pacientů se sérologicky aktivní EBV infekcí. Domníváme se, že to mohlo být způsobeno pandemií viru SARS-CoV-2. K potvrzení této hypotézy bohužel nejsou dostupná potřebná data. Nicméně několik studií potvrdilo spojitost reaktive EBV a dalších herpesvirů u pacientů s diagnostikovaným onemocněním covid-19 a u pacientů s tzv. long-covid symptomy. Reaktivace EBV byla také spojena s horším průběhem covidu-19 a delší dobou hospitalizace. (Lehner *et al.*, 2020; Gold *et al.*, 2021; Paolucci *et al.*, 2021; Simonnet *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021; Zubchenko *et al.*, 2022)

9. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byly přehledně podány informace o viru Epstein-Barrův, onemocněních, která přímo způsobuje nebo se významně podílí na jejich patogenezi, včetně informací o léčbě a aktuálních poznatků o výzkumu vakcín.

Za roky 2019-2022 bylo v laboratoři infekční sérologie a virologie společnosti Vidia-Diagnostika otestováno 14 736 pacientů na přítomnost specifických protilátek proti EBV. 263 pacientů na přítomnost heterofilních protilátek a 42 pacientů na přítomnost EBV DNA. Nejvíce pozitivních nálezů heterofilních protilátek bylo podle očekávání zachyceno u pacientů ve věku 10-20 let. Věkové rozmezí pozitivních pacientů bylo od 3 do 31 let s nejvyšším počtem pozitivních ve věku 15 a 19 let. Celkový záchyt pozitivních pacientů činil 12 %. EBV DNA byla detekována pouze u bronchoalveolární laváže (BAL), buffy coatu a séra. Celkový záchyt EBV DNA byl 19 %.

Věkové rozmezí pacientů s obrazem primární infekce EBV bylo 1-44 let. Incidence primární infekce EBV byla nejvyšší ve věku 15-19 let s maximem v 17 letech. Výskyt nevykazoval sezónní charakter.

Promořenost testovaného souboru byla nižší než očekávaná, a to 86,7 %. Většinu nepromořené populace testovaného souboru tvořili pacienti do 20 let (11,5 %). Promořenost nad 20 let věku pacienta činila 98,2 %.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
BCR	<i>B-cell receptor</i>	B-buněčný receptor
BL	<i>Burkitt's lymphoma</i>	Burkittův lymfom
CD	<i>Cluster of differentiation/designation</i>	Diferenční skupina leukocytů
CLIA	<i>Chemiluminiscent immunoassay</i>	Chemiluminiscenční imunoanalýza
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Deoxyribonukleová kyselina
EA	<i>Early antigen</i>	Časný antigen EBV
EBERs	<i>Epstein-Barr virus-encoded small RNAs</i>	Malé RNA kódované virem Epstein-Barrové
EBNA	<i>Epstein Barr nuclear antigen</i>	Nukleární antigen EBV
EBV	<i>Epstein Barr virus</i>	Virus Epstein-Barrové
EBV-LPD	<i>Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disease</i>	EBV asociovaná lymfoproliferativní nemoc
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Enzymová imunoanalýza
GC	<i>Gastric carcinoma</i>	Karcinom žaludku
HL	<i>Hodgkin's lymphoma</i>	Hodgkinův lymfom
HRS	<i>Hodgkin and Reed-Sternberg cells</i>	Hodgkinovy buňky a buňky Reedové-Sternberga
IL	<i>Interleukine</i>	interleukin
IM	<i>Infectious mononucleosis</i>	Infekční mononukleóza
LMP	<i>Latent membrane protein</i>	Latentní membránový protein
MBA	<i>Microblot array</i>	-
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Hlavní histokompatibilní komplex
MM	-	Mozkomíšni mok
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	-
Nc-RNAs	<i>Noncoding RNAs</i>	Nekódující části RNA
NIF	-	Nepřímá imunofluorescence
NMHC-IIA	non-muscle myosin heavy chain IIA	-
NPC	<i>Nasopharyngeal carcinoma</i>	Nasofaryngeální karcinom

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Polymerázová řetězová reakce
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>	retinoblastomový protein
PTLD	<i>Post-transplant lymphoproliferative disorder/disease</i>	Potransplantační lymfoproliferativní nemoc
RLU	<i>Relative light/luminiscence units</i>	Relativní světelné jednotky
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ribonukleová kyselina
TGF	<i>Tumor necrosis factor</i>	Tumor nekrotizující faktor
VCA	<i>Viral capsid antigen</i>	Strukturální protein EBV
ZEBRA	<i>Z Epstein Barr Replication Activator</i>	-

11. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Interpretace serologických nálezů vyšetření EBV specifických protilátek.....	31
Tab. 2: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření EBV IgM.....	37
Tab. 3: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření VCA IgG	37
Tab. 4: Obsah reagenčního integrálu pro vyšetření EBNA IgG	38
Tab. 5: Interpretace výsledků vyšetření EBV specifických protilátek metodou CLIA	39
Tab. 6: Schéma aplikace kontrol a vzorků pro vyšetření avidity IgG protilátek	47
Tab. 7: Celkové vyhodnocení MBA	50
Tab. 8: Interpretace výsledků MBA EBV v klinickém kontextu.....	51
Tab. 9: DNA PCR amplifikační profil.....	55
Tab. 10: Interpretace výsledků PCR	55
Tab. 11: Algoritmus třídění pacientů podle sérologického obrazu	57
Tab. 12: Počet a hodnocení vzorků vyšetřených IM testem	58
Tab. 13: Četnost sérologických nálezů IM testu podle pohlaví a věku pacientů.....	59
Tab. 14: Vyhodnocení sérologických markerů metodou CLIA.....	61
Tab. 15: Počet vyšetření nepřímou imunofluorescencí za jednotlivé roky 2019-2022..	64
Tab. 16: Hodnocení vyšetření anti-EA IgG za jednotlivé roky 2019-2022	64
Tab. 17: Diferenciace zvýšených protilátek anti-EA IgG	64
Tab. 18: Výsledky vyšetření anti-VCA IgM metodou NIF	64
Tab. 19: Výsledky vyšetření anti-VCA IgG metodou NIF	64
Tab. 20: Počet vyšetření podle pohlaví v jednotlivých letech 2019-2022	65
Tab. 21: Výsledky vyšetření avidity za roky 2019-2022	65
Tab. 22: Četnost nízkoavidních a hraničních výsledků avidity podle věku a pohlaví pacienta	65
Tab. 23: Hodnocení vyšetření MBA za rok 2022.....	66
Tab. 24: Hodnocení vyšetření MBA za rok 2022 podle věku pacienta	66
Tab. 25: Počet vyšetření EBV DNA za roky 2019-2022	67
Tab. 26: Výsledky vyšetření EBV DNA podle typu materiálu	68
Tab. 27: Počet pacientů vyšetřených PCR podle věku a pohlaví	68
Tab. 28: Počet EBV DNA pozitivních pacientů podle věku a pohlaví.....	68
Tab. 29: Četnost jednotlivých stádií EBV infekce za roky 2019-2022.....	69

Tab. 30: Četnost primoinfekce EBV podle věkových kategorií	72
Tab. 31: Četnost primoinfekce u pacientů mezi 15. a 19. rokem života	73
Tab. 32: Četnost séronegativních pacientů podle věku	75

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Virová částice EBV v elektronovém mikroskopu	15
Obr. 2: Zjednodušený model životního cyklu EBV	16
Obr. 3: Povlaky na mandlích a Holzelovo znamení na měkkém patře	19
Obr. 4: Basseho znamení	19
Obr. 5: Reaktivní T-lymfocyty v nátěru periferní krve u pacienta s infekční mononukleózou	20
Obr. 6: Burkittův lymfom v pravé části mandibuly u 11 letého chlapce z Afriky	21
Obr. 7: Burkittův lymfom zasahující do všech kvadrantů čelistí u 3 letého chlapce z Afriky	22
Obr. 8: Nález velkých atypických lymfocytů s vakuolizací v nátěru periferní krve u pacientů s BL	22
Obr. 9: Histologický preparát Hodgkinova lymfomu	23
Obr. 10: Makulopapulózní exantém při IM po podání aminopenicilinových ATB	26
Obr. 11: Dynamika tvorby protilátek při EBV infekci	30
Obr. 12: EBERs v biopsii nasofaryngeálního karcinomu detekované pomocí FISH	32
Obr. 13: Diagnostická souprava pro vyšetření heterofilních protilátek	33
Obr. 14: Postup provedení IM testu ze séra/plazmy, venepunkce a odběru z prstu.....	34
Obr. 15: Pozitivní a negativní IM test	35
Obr. 16: Interpretace IM testu.....	35
Obr. 17: Automatický analyzátor Liaison XL	36
Obr. 18: Obecné schéma reagenčního integrálu.....	37
Obr. 19: Automatický přístroj pro zpracování IF sklíček Helmed Processor	40
Obr. 20: Diagnostická souprava IF-VIDITEST k vyšetření anti-EA IgG	41
Obr. 21: Diagnostická souprava IF-VIDITEST k vyšetření anti-VCA IgG a IgM	41
Obr. 22: Pozitivní imunofluorescence anti-VCA IgG	43
Obr. 23: Pozitivní fluorescence anti-EA proti D složce	43
Obr. 24: Pozitivní fluorescence anti-EA proti R složce.....	44
Obr. 25: Negativní fluorescence anti-EA.....	44
Obr. 26: Negativní fluorescence anti-VCA	45

Obr. 27: Automatický analyzátor Agility	48
Obr. 28: Rozložení antigenů a kontrolních spotů v jamce	49
Obr. 29: Schéma plné krve po centrifugaci	52
Obr. 30: Automatický izolátor croBEE NA16 NucleicAcid Extraction System Plus	52
Obr. 31: Umístění zkumavek a špiček ve stojánku v přístroji croBEE.....	54

13. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Vývoj incidence infekční mononukleózy v ČR v letech 1985-2022.....	14
Graf 2: Hodnocení vzorků vyšetřených IM testem	58
Graf 3: Porovnání pozitivních mužů a žen v jednotlivých věkových kategoriích.....	59
Graf 4: Počet vzorků vyšetřených metodou CLIA	60
Graf 5: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2019.....	61
Graf 6: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2020.....	62
Graf 7: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2021.....	62
Graf 8: Výsledky vyšetření CLIA za rok 2022.....	63
Graf 9: Porovnání výsledků avidity za roky 2019-2022	65
Graf 10: Porovnání nízkoavidních a hraničních výsledků podle pohlaví a věku pacienta	66
Graf 11: Výsledky MBA podle věku pacienta.....	67
Graf 12: Četnost jednotlivých stádií v roce 2019.....	69
Graf 13: Četnost jednotlivých stádií v roce 2020.....	70
Graf 14: Četnost jednotlivých stádií v roce 2021.....	70
Graf 15: Četnost jednotlivých stádií v roce 2022.....	71
Graf 16: Četnost primoinfekcí EBV v jednotlivých letech 2019-2022.....	72
Graf 17: Procentuální záchyt primoinfekcí EBV v jednotlivých měsících za roky 2019-2022	72
Graf 18: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2019	73
Graf 19: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2020	73
Graf 20: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2021	74
Graf 21: Četnost primoinfekce EBV podle věku a pohlaví v roce 2022	74
Graf 22: Procentuální podíl všech séronegativních pacientů podle věku	75
Graf 23: Procentuální podíl séronegativních pacientů podle věku v jednotlivých letech 2019-2022	76

14. POUŽITÁ LITERATURA

1. Aldinucci, D., Poletto, D., Nanni, P., Degan, M., Gloghini, A., Di Francia, R., Russo, S., Carbone, A., Pinto, A., Gattei, V., 2002. Hodgkin and Reed-Sternberg cells express functional c-kit receptors and interact with primary fibroblasts from Hodgkin's disease-involved lymph nodes through soluble and membrane-bound stem cell factor. *Br. J. Haematol.* 118, 1055–1064. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03732.x>
2. Alfieri, C., Tanner, J., Carpentier, L., Perpête, C., Savoie, A., Paradis, K., Delage, G., Joncas, J., 1996. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87, 812–817.
3. Ambinder, R.F., Browning, P.J., Lorenzana, I., Leventhal, B.G., Cosenza, H., Mann, R.B., MacMahon, E.M.E., Medina, R., Cardona, V., Grufferman, S., Olshan, A., Levin, A., Petersen, E.A., Blattner, W., Levine, P.H., 1993. Epstein-Barr Virus and Childhood Hodgkin's Disease in Honduras and the United States. *Blood* 81, 462–467. <https://doi.org/10.1182/blood.V81.2.462.462>
4. Ambrožová, H., 2005. Infekční mononukleóza. *Pediatric pro praxi* 244–246.
5. Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G., Stein, H., 1989. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 74, 810–816.
6. Andersson, J., Sköldenberg, B., Ernberg, I., Britton, S., Henle, W., Andersson, U., 1985. Acyclovir treatment in primary Epstein-Barr virus infection. A double-blind placebo-controlled study. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 47, 107–115.
7. Andersson, J., Sköldenberg, B., Henle, W., Giesecke, J., Ortqvist, A., Julander, I., Gustavsson, E., Akerlund, B., Britton, S., Ernberg, I., 1987. Acyclovir treatment in infectious mononucleosis: a clinical and virological study. *Infection* 15 Suppl 1, S14-20. <https://doi.org/10.1007/BF01650106>
8. Andersson-Anvret, M., Forsby, N., Klein, G., Henle, W., 1977. Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination. *Int. J. Cancer* 20, 486–494. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910200403>
9. Balfour, H.H., Sifakis, F., Sliman, J.A., Knight, J.A., Schmeling, D.O., Thomas, W., 2013. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6–19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J. Infect. Dis.* 208, 1286–1293. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit321>
10. Bartošová, D., 2003. Dětské infekční nemoci. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. 284 s. ISBN 80-7262-206-4.
11. Bei, J.-X., Su, W.-H., Ng, C.-C., Yu, K., Chin, Y.-M., Lou, P.-J., Hsu, W.-L., McKay, J.D., Chen, C.-J., Chang, Y.-S., Chen, L.-Z., Chen, M.-Y., Cui, Q., Feng, F.-T., Feng, Q.-S., Guo, Y.-M., Jia, W.-H., Khoo, A.S.-B., Liu, W.-S., Mo, H.-Y., Pua, K.-C., Teo, S.-H., Tse, K.-P., Xia, Y.-F., Zhang, H., Zhou, G.-Q., Liu, J.-J., Zeng, Y.-X., Hildesheim, A., 2016. A GWAS meta-analysis and replication study identifies a novel locus within CLPTM1L/TERT associated with nasopharyngeal carcinoma in individuals of Chinese ancestry. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer*

- Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. 25, 188–192.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0144>
12. Belada, D., Trněný, M., Campr, V., Doubek, M., Dědečková, K., Janíková, A., Jindra, P., Kaščák, M., Klánová, M., Klener, P., Kopecký, O., Kouba, M., Král, Z., Kopečková, K., Marková, J., Michalka, J., Móciková, H., Obr, A., Polgárová, K., Polívka, J., Procházka, V., Pytlík, R., Rusinová, K., Smolej, L., Sýkorová, A., Šálek, C., Špaček, M., Válková, V., Vokurka, S., Bučková, H., Kabičková, E., Štěrba, J., 2023. DIAGNOSTICKÉ A LÉČEBNÉ POSTUPY U NEMOCNÝCH S MALIGNÍMI LYMFOMY. 13 vyd. Hradec Králové: HK CREDIT s.r.o., 2023. 292. ISBN 978-80-905210-6-3.
 13. Beneš, J., 2009. Infekční lékařství. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
 14. Blake, J.M., Edwards, J.M., Fletcher, W., McSwiggan, D.A., Pereira, M.S., 1976. Measurement of heterophil antibody and antibodies to EB viral capsid antigen IgG and IgM in suspected cases of infectious mononucleosis. *J. Clin. Pathol.* 29, 841–847. <https://doi.org/10.1136/jcp.29.9.841>
 15. Bollard, C.M., Gottschalk, S., Torrano, V., Diouf, O., Ku, S., Hazrat, Y., Carrum, G., Ramos, C., Fayad, L., Shpall, E.J., Pro, B., Liu, H., Wu, M.-F., Lee, D., Sheehan, A.M., Zu, Y., Gee, A.P., Brenner, M.K., Heslop, H.E., Rooney, C.M., 2014. Sustained Complete Responses in Patients With Lymphoma Receiving Autologous Cytotoxic T Lymphocytes Targeting Epstein-Barr Virus Latent Membrane Proteins. *J. Clin. Oncol.* 32, 798–808. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.5304>
 16. Brousset, P., Chittal, S., Schlaifer, D., Icart, J., Payen, C., Rigal-Huguet, F., Voigt, J.J., Delsol, G., 1991. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMeX) sections. *Blood* 77, 1781–1786.
 17. Burkitt, D., 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* 46, 218–223. <https://doi.org/10.1002/bjs.18004619704>
 18. Chakravorty, S., Afzali, B., Kazemian, M., 2022. EBV-associated diseases: Current therapeutics and emerging technologies. *Front. Immunol.* 13.
 19. Chan, S.H., Day, N.E., Kunaratnam, N., Chia, K.B., Simons, M.J., 1983. HLA and nasopharyngeal carcinoma in Chinese--a further study. *Int. J. Cancer* 32, 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910320206>
 20. Chang, K.L., Albújar, P.F., Chen, Y.Y., Johnson, R.M., Weiss, L.M., 1993. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* 81, 496–501.
 21. Chen, J., Longnecker, R., 2019. Epithelial cell infection by Epstein-Barr virus. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 674–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz023>
 22. Chen, T., Song, J., Liu, H., Zheng, H., Chen, C., 2021. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Sci. Rep.* 11, 10902. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90351-y>
 23. Comoli, P., Pedrazzoli, P., Maccario, R., Basso, S., Carminati, O., Labirio, M., Schiavo, R., Secondino, S., Frasson, C., Perotti, C., Moroni, M., Locatelli, F., Siena, S., 2005. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous

- Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 8942–8949. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.6195>
24. Corrales, I., Giménez, E., Navarro, D., 2014. Evaluation of the Architect Epstein-Barr Virus (EBV) Viral Capsid Antigen (VCA) IgG, VCA IgM, and EBV Nuclear Antigen 1 IgG Chemiluminescent Immunoassays for Detection of EBV Antibodies and Categorization of EBV Infection Status Using Immunofluorescence Assays as the Reference Method. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 21, 684–688. <https://doi.org/10.1128/CVI.00104-14>
 25. Cozen, W., Timofeeva, M., Li, D., Diepstra, A., Hazelett, D., Delahaye-Sourdeix, M., Edlund, C., Franke, L., Rostgaard, K., Van Den Berg, D., Cortessis, V., Smedby, K., Glaser, S., H-J, W., Robison, L., Mack, T., Ghesquieres, H., Hwang, A., Nieters, A., de Sanjose, S., Lightfoot, T., Becker, N., Maynadie, M., Foretova, L., Roman, E., Benavente, Y., Rand, K., Nathwani, B., Glimelius, B., Staines, A., Boffetta, P., Link, B., Kiemeny, L., Ansell, S., Bhatia, S., Strong, L., Galan, P., Vatten, L., Habermann, T., Duell, E., Lake, A., Veenstra, R., Visser, L., Liu, Y., Urayama, K., Montgomery, D., Gaborieau, V., Weiss, L., Byrnes, G., Lathrop, M., Cocco, P., Best, T., Skol, A., H-O, A., Melbye, M., Cerhan, J., Gallagher, A., Taylor, G., Slager, S., Brennan, P., Coetzee, G., Conti, D., Onel, K., Jarrett, R., Hjalgrim, H., van den Berg, A., McKay, J., 2014. A Meta-Analysis of Hodgkin Lymphoma Reveals 19p13.3 TCF3 as a Novel Susceptibility Locus. *Nat. Commun.* 5, 3856. <https://doi.org/10.1038/ncomms4856>
 26. Cui, J., Yan, W., Xu, S., Wang, Q., Zhang, W., Liu, W., Ni, A., 2018. Anti-Epstein-Barr virus antibodies in Beijing during 2013–2017: What we have found in the different patients. *PLoS ONE* 13, e0193171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193171>
 27. Datta, A.K., Colby, B.M., Shaw, J.E., Pagano, J.S., 1980. Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5163–5166.
 28. Davidsohn, I., 1937. SEROLOGIC DIAGNOSIS OF INFECTIOUS MONONUCLEOSIS. *J. Am. Med. Assoc.* 108, 289–295. <https://doi.org/10.1001/jama.1937.02780040039009>
 29. de Schryver, A., Klein, G., Henle, W., Henle, G., 1974. EB virus-associated antibodies in Caucasian patients with carcinoma of the nasopharynx and in long-term survivors after treatment. *Int. J. Cancer* 13, 319–325. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910130307>
 30. de-Thé, G., Day, N.E., Geser, A., Lavoué, M.F., Ho, J.H., Simons, M.J., Sohler, R., Tukei, P., Vonka, V., Zavadova, H., 1975. Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. *IARC Sci. Publ.* 3–16.
 31. Diepstra, A., Niens, M., Vellenga, E., van Imhoff, G.W., Nolte, I.M., Schaapveld, M., van der Steege, G., van den Berg, A., Kibbelaar, R.E., te Meerman, G.J., Poppema, S., 2005. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. *Lancet Lond. Engl.* 365, 2216–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66780-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66780-3)
 32. Dotti, G., Fiocchi, R., Motta, T., Gamba, A., Gotti, E., Gridelli, B., Borleri, G., Manzoni, C., Viero, P., Remuzzi, G., Barbui, T., Rambaldi, A., 2000. Epstein-Barr virus-negative lymphoproliferate disorders in long-term survivors after heart,

- kidney, and liver transplant. *Transplantation* 69, 827–833. <https://doi.org/10.1097/00007890-200003150-00027>
33. Dowd, J.B., Palermo, T., Brite, J., McDade, T.W., Aiello, A., 2013. Seroprevalence of Epstein-Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. *PLoS ONE* 8, e64921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064921>
 34. Drexler, H.G., 1992. Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk. Lymphoma* 8, 283–313. <https://doi.org/10.3109/10428199209051008>
 35. Drexler, H.G., Gignac, S.M., Hoffbrand, A.V., Minowada, J., 1989. Formation of multinucleated cells in a Hodgkin's-disease-derived cell line. *Int. J. Cancer* 43, 1083–1090. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910430622>
 36. Drosu, N.C., Edelman, E.R., Housman, D.E., 2020. Tenofovir prodrugs potently inhibit Epstein-Barr virus lytic DNA replication by targeting the viral DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 12368–12374. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002392117>
 37. Dunmire, S., Grimm, J.M., Schmeling, D., Balfour, H., Hogquist, K., 2015. The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog.* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005286>
 38. Enciso-Mora, V., Broderick, P., Ma, Y., Jarrett, R.F., Hjalgrim, H., Hemminki, K., van den Berg, A., Olver, B., Lloyd, A., Dobbins, S.E., Lightfoot, T., van Leeuwen, F.E., Försti, A., Diepstra, A., Broeks, A., Vijayakrishnan, J., Shield, L., Lake, A., Montgomery, D., Roman, E., Engert, A., von Strandmann, E.P., Reiners, K.S., Nolte, I.M., Smedby, K.E., Adami, H.-O., Russell, N.S., Glimelius, B., Hamilton-Dutoit, S., de Bruin, M., Ryder, L.P., Molin, D., Sorensen, K.M., Chang, E.T., Taylor, M., Cooke, R., Hofstra, R., Westers, H., van Wezel, T., van Eijk, R., Ashworth, A., Rostgaard, K., Melbye, M., Swerdlow, A.J., Houlston, R.S., 2010. A genome-wide association study of Hodgkin Lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21, and 10p14 (GATA3). *Nat. Genet.* 42, 1126–1130. <https://doi.org/10.1038/ng.696>
 39. Epstein, A., 2012. Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein-Barr virus. *Br. J. Haematol.* 156, 777–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09008.x>
 40. Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., 1964. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet Lond. Engl.* 1, 702–703. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)
 41. Ernberg, I., Andersson, J., 1986. Acyclovir efficiently inhibits oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus in patients with acute infectious mononucleosis. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt 10), 2267–2272. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-10-2267>
 42. Evans, A.S., Niederman, J.C., McCollum, R.W., 1968. Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus. *N. Engl. J. Med.* 279, 1121–1127. <https://doi.org/10.1056/NEJM196811212792101>
 43. Fátorová, I., n.d. Vybrané patologické nálezy v nátěrech periferní krve [WWW Document]. URL <https://www.ipvz.cz/seznam-souboru/5222-vybrane-patologicke-nalezky-v-naterech-pk-modul-2.pdf>
 44. Feng, B.-J., Huang, W., Shugart, Y.Y., Lee, M.K., Zhang, F., Xia, J.-C., Wang, H.-Y., Huang, T.-B., Jian, S.-W., Huang, P., Feng, Q.-S., Huang, L.-X., Yu, X.-J., Li, D., Chen,

- L.-Z., Jia, W.-H., Fang, Y., Huang, H.-M., Zhu, J.-L., Liu, X.-M., Zhao, Y., Liu, W.-Q., Deng, M.-Q., Hu, W.-H., Wu, S.-X., Mo, H.-Y., Hong, M.-F., King, M.C., Chen, Z., Zeng, Y.-X., 2002. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4. *Nat. Genet.* 31, 395–399. <https://doi.org/10.1038/ng932>
45. Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., Fearon, D.T., 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4510–4514.
 46. Fleisher, G., Lennette, E.T., Henle, G., Henle, W., 1979. Incidence of heterophil antibody responses in children with infectious mononucleosis. *J. Pediatr.* 94, 723–728. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(79\)80138-9](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(79)80138-9)
 47. Fourcade, G., Germe, R., Guerber, F., Lupo, J., Baccard, M., Seigneurin, A., Semenova, T., Morand, P., Epaulard, O., 2017. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000–2016. *PLOS ONE* 12, e0175574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175574>
 48. Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., 1985. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1490–1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1490>
 49. Gärtner, B.C., Fischinger, J.M., Roemer, K., Mak, M., Fleurent, B., Mueller-Lantzsch, N., 2001. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr Virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J. Virol. Methods* 93, 89–96. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(00\)00301-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(00)00301-3)
 50. Gatherer, D., Depledge, D.P., Hartley, C.A., Szpara, M.L., Vaz, P.K., Benkő, M., Brandt, C.R., Bryant, N.A., Dastjerdi, A., Doszpoly, A., Gompels, U.A., Inoue, N., Jarosinski, K.W., Kaul, R., Lacoste, V., Norberg, P., Origgi, F.C., Orton, R.J., Pellett, P.E., Schmid, D.S., Spatz, S.J., Stewart, J.P., Trimpert, J., Waltzek, T.B., Davison, A.J., 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J. Gen. Virol.* 102. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001673>
 51. GeneProof, 2021. Návod k použití diagnostické soupravy GeneProof Epstein-Barr Virus (EBV) PCR Kit, 2021. [online] GeneProof a.s. [cit. 2023-01-22] Dostupné z: <https://www.geneproof.com/geneproof-epstein-barr-virus-ebv-mc-pcr-kit/p6828>.
 52. Gold, J.E., Okyay, R.A., Licht, W.E., Hurley, D.J., 2021. Investigation of Long COVID Prevalence and Its Relationship to Epstein-Barr Virus Reactivation. *Pathogens* 10, 763. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060763>
 53. Golubjatnikov, R., Allen, V.D., Steadman, M., Del Pilar Olmos Blanc, null, Inhorn, S.L., 1973. Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and Toxoplasma in a Mexican highland community. *Am. J. Epidemiol.* 97, 116–124. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121488>
 54. Gu, S.Y., Huang, T.M., Ruan, L., Miao, Y.H., Lu, H., Chu, C.M., Motz, M., Wolf, H., 1995. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev. Biol. Stand.* 84, 171–177.
 55. Hamilton-Dutoit, S.J., Raphael, M., Audouin, J., Diebold, J., Lisse, I., Pedersen, C., Oksenhendler, E., Marelle, L., Pallesen, G., 1993. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-

- related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood* 82, 619–624.
56. Hejnar, P., 2001. Nepřímá diagnostika Lymeské borreliózy a infekce virem Epstein-Barrové. *Interní Medicína Praxi* 3, 355–357.
 57. Henle, G., Henle, W., Diehl, V., 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 94–101. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.1.94>
 58. Henle, G., Henle, W., Klein, G., 1971. Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus-infected cells. *Int. J. Cancer* 8, 272–282. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910080212>
 59. Henle, G., Lennette, E.T., Alspaugh, M.A., Henle, W., 1979. Rheumatoid factor as a cause of positive reactions in tests for Epstein-Barr virus-specific IgM antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 36, 415–422.
 60. Henle, W., Henle, G., Ho, H.C., Burtin, P., Cachin, Y., Clifford, P., de Schryver, A., de-Thé, G., Diehl, V., Klein, G., 1970. Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 225–231.
 61. Heslop, H.E., Slobod, K.S., Pule, M.A., Hale, G.A., Rousseau, A., Smith, C.A., Bollard, C.M., Liu, H., Wu, M.-F., Rochester, R.J., Amrolia, P.J., Hurwitz, J.L., Brenner, M.K., Rooney, C.M., 2010. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115, 925–935. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239186>
 62. Hinuma, Y., Ota-Hatano, R., Suto, T., Numazaki, Y., 1969. High incidence of Japanese infants with antibody to a herpes-type virus associated with cultured Burkitt lymphoma cells. *Jpn. J. Microbiol.* 13, 309–311. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1969.tb00472.x>
 63. Hjalgrim, H., Rostgaard, K., Johnson, P.C.D., Lake, A., Shield, L., Little, A.-M., Ekstrom-Smedby, K., Adami, H.-O., Glimelius, B., Hamilton-Dutoit, S., Kane, E., Taylor, G.M., McConnachie, A., Ryder, L.P., Sundstrom, C., Andersen, P.S., Chang, E.T., Alexander, F.E., Melbye, M., Jarrett, R.F., 2010. HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6400–6405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915054107>
 64. Hocqueloux, L., Causse, X., Valery, A., Jandali, J.-C., Maitre, O., Soin, C., Buret, J., Ouane, F., Niang, M., Mille, C., Prazuck, T., Guinard, J., Guigon, A., 2015. The high burden of hospitalizations for primary EBV infection: a 6-year prospective survey in a French hospital. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 1041.e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.015>
 65. Hodgkin, 1832. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chir. Trans.* 17, 68–114.
 66. Horwitz, C.A., Henle, W., Henle, G., Polesky, H., Balfour, H.H., Siem, R.A., Borken, S., Ward, P.C.J., 1977. Heterophil-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illnesses: Laboratory confirmation of 43 cases. *Am. J. Med.* 63, 947–957. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(77\)90550-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(77)90550-2)
 67. Hu, S.P., Day, N.E., Li, D.R., Luben, R.N., Cai, K.L., Ou-Yang, T., Li, B., Lu, X.Z., Ponder, B.A.J., 2005. Further evidence for an HLA-related recessive mutation in

- nasopharyngeal carcinoma among the Chinese. *Br. J. Cancer* 92, 967–970. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602347>
68. Huang, J., Pang, W.S., Lok, V., Zhang, L., Lucero-Prisno, D.E., Xu, W., Zheng, Z.-J., Elcarte, E., Withers, M., Wong, M.C.S., NCD Global Health Research Group, A. of P.R.U. (APRU), 2022. Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 15, 57. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01281-9>
 69. Huang, X., Kushekhar, K., Nolte, I., Kooistra, W., Visser, L., Bouwman, I., Kouprie, N., Veenstra, R., van Imhoff, G., Olver, B., Houlston, R.S., Poppema, S., Diepstra, A., Hepkema, B., van den Berg, A., 2012. HLA Associations in Classical Hodgkin Lymphoma: EBV Status Matters. *PLoS ONE* 7, e39986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039986>
 70. Hubáček, P., 2013. Laboratorní diagnostika EBV infekce. 2013. [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/laboratorni-diagnostika-ebv-infekce-473076>.
 71. Huh, J., Park, C., Juhng, S., Kim, C.E., Poppema, S., Kim, C., 1996. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with Epstein-Barr virus infection. *Cancer* 77, 949–955. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19960301\)77:5<949::aid-cnrc22>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19960301)77:5<949::aid-cnrc22>3.0.co;2-2)
 72. Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Dallenbach, F., Korbjuhn, P., Dimmler, C., Stein, H., 1992. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue: expression and cellular localization of EBV gene products. *Br. J. Haematol.* 82, 689–694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb06945.x>
 73. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Epstein-Barr Virus, Biological Agents. International Agency for Research on Cancer.
 74. Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M.H., Schwinger, W., Nathrath, M., Schumm, M., Stevanovic, S., Handgretinger, R., Lang, P., Feuchtinger, T., 2013. Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 39–48. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.8495>
 75. Ito, Y., Ishimoto, A., Hosokawa, T., Hotta, S., Noerjasin, B., 1970. Anti-EB virus antibody titer in sera collected from human subjects of Surabaya, Indonesia, in 1968. *Kobe J. Med. Sci.* 16, 261–265.
 76. Ito, Y., Suzuki, M., Kawada, J., Kimura, H., 2016. Diagnostic values for the viral load in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic active Epstein-Barr virus disease. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* 22, 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.11.002>
 77. Jain, A., Nalesnik, M., Reyes, J., Pokharna, R., Mazariegos, G., Green, M., Eghtesad, B., Marsh, W., Cacciarelli, T., Fontes, P., Abu-Elmagd, K., Sindhi, R., Demetris, J., Fung, J., 2002. Posttransplant Lymphoproliferative Disorders in Liver Transplantation. *Ann. Surg.* 236, 429–437.
 78. Jean-Pierre, V., Lupo, J., Buisson, M., Morand, P., Germi, R., 2021. Main Targets of Interest for the Development of a Prophylactic or Therapeutic Epstein-Barr Virus Vaccine. *Front. Microbiol.* 12, 701611. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.701611>

79. Kanekiyo, M., Bu, W., Joyce, M.G., Meng, G., Whittle, J.R.R., Baxa, U., Yamamoto, T., Narpala, S., Todd, J.-P., Rao, S.S., McDermott, A.B., Koup, R.A., Rossmann, M.G., Mascola, J.R., Graham, B.S., Cohen, J.I., Nabel, G.J., 2015. Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell* 162, 1090–1100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.043>
80. Kangro, H.O., Osman, H.K., Lau, Y.L., Heath, R.B., Yeung, C.Y., Ng, M.H., 1994. Seroprevalence of antibodies to human herpesviruses in England and Hong Kong. *J. Med. Virol.* 43, 91–96. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890430117>
81. Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S.P., Snopok, B., Isagulians, M., Szekely, L., Klein, G., 2008. EBV-encoded EBNA-6 binds and targets MRS18-2 to the nucleus, resulting in the disruption of pRb-E2F1 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5489–5494. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801053105>
82. Kenney, S.C., 2007. Reactivation and lytic replication of EBV, in: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge.
83. Khan, G., Hashim, M.J., 2014. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. *Infect. Agent. Cancer* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-38>
84. Khyatti, M., Patel, P.C., Stefanescu, I., Menezes, J., 1991. Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Virol.* 65, 996–1001.
85. Kleinerová, Mud.J., 2005. *Infekční oddělení, o. z. Nemocnice Prostějov, Středomoravská nemocniční, a. s.*
86. Klemola, E., Von Essen, R., Henle, G., Henle, W., 1970. Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J. Infect. Dis.* 121, 608–614. <https://doi.org/10.1093/infdis/121.6.608>
87. Krejčí, D., Pehalová, L., Talábová, A., Pokorová, K., Katinová, I., Mužík, J., Dušek, L., 2018. Novotvary 2018 – Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice. ÚZIS ČR. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>.
88. Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., Hansmann, M.L., 1994. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10962–10966.
89. Lai, P.K., Mackay-Scollay, E.M., Alpers, M.P., 1975. Epidemiological studies of Epstein-Barr herpesvirus infection in Western Australia. *J. Hyg. (Lond.)* 74, 329–337. <https://doi.org/10.1017/s0022172400046842>
90. Leblond, V., Davi, F., Charlotte, F., Dorent, R., Bitker, M.O., Sutton, L., Gandjbakhch, I., Binet, J.L., Raphael, M., 1998. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16, 2052–2059. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.6.2052>

91. Lehner, G.F., Klein, S.J., Zoller, H., Peer, A., Bellmann, R., Joannidis, M., 2020. Correlation of interleukin-6 with Epstein–Barr virus levels in COVID-19. *Crit. Care* 24, 657. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03384-6>
92. Leogrande, G., Jirillo, E., 1993. Studies on the epidemiology of child infections in the Bari area (south Italy). VII. Epidemiology of Epstein-Barr virus infections. *Eur. J. Epidemiol.* 9, 368–372. <https://doi.org/10.1007/BF00157392>
93. Li, Q., Spriggs, M.K., Kovats, S., Turk, S.M., Comeau, M.R., Nepom, B., Hutt-Fletcher, L.M., 1997. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J. Virol.* 71, 4657–4662.
94. Li, X., Fasano, R., Wang, E., Yao, K.-T., Marincola, F.M., 2009. HLA Associations with Nasopharyngeal Carcinoma. *Curr. Mol. Med.* 9, 751–765.
95. Li, X., Ghandri, N., Piancatelli, D., Adams, S., Chen, D., Robbins, F.-M., Wang, E., Monaco, A., Selleri, S., Bouaouina, N., Stroncek, D., Adorno, D., Chouchane, L., Marincola, F.M., 2007. Associations between HLA Class I alleles and the prevalence of nasopharyngeal carcinoma (NPC) among Tunisians. *J. Transl. Med.* 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-22>
96. Lin, C.-L., Lo, W.-F., Lee, T.-H., Ren, Y., Hwang, S.-L., Cheng, Y.-F., Chen, C.-L., Chang, Y.-S., Lee, S.P., Rickinson, A.B., Tam, P.K.H., 2002. Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62, 6952–6958.
97. Linderholm, M., Boman, J., Juto, P., Linde, A., 1994. Comparative evaluation of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus-specific serology. *J. Clin. Microbiol.* 32, 259–261.
98. Liu, Y., Sattarzadeh, A., Diepstra, A., Visser, L., van den Berg, A., 2014. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: An actively shaped and essential tumor component. *Semin. Cancer Biol., The microenvironment in lymphomas* 24, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.07.002>
99. Lobovská, A., 2002. *Infekční nemoci. 1. vydání.* Praha: Karolinum, 2002. 263 s. ISBN 80-246-0116-8.
100. Lu, C.-C., Chen, J.-C., Jin, Y.-T., Yang, H.-B., Chan, S.-H., Tsai, S.-T., 2003. Genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma within the HLA-A locus in Taiwanese. *Int. J. Cancer* 103, 745–751. <https://doi.org/10.1002/ijc.10861>
101. Lu, C.-C., Chen, J.-C., Tsai, S.-T., Jin, Y.-T., Tsai, J.-C., Chan, S.-H., Su, I.-J., 2005. Nasopharyngeal carcinoma-susceptibility locus is localized to a 132 kb segment containing HLA-A using high-resolution microsatellite mapping. *Int. J. Cancer* 115, 742–746. <https://doi.org/10.1002/ijc.20946>
102. Lünemann, A., Rowe, M., Nadal, D., 2015. Innate Immune Recognition of EBV. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 391, 265–287. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_9
103. McDonald, R.A., Smith, J.M., Ho, M., Lindblad, R., Ikle, D., Grimm, P., Wyatt, R., Arar, M., Liereman, D., Bridges, N., Harmon, W., CCTPT Study Group, 2008. Incidence of PTLD in pediatric renal transplant recipients receiving basiliximab, calcineurin inhibitor, sirolimus and steroids. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 8, 984–989. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02167.x>

104. ModernaTX, Inc., 2023a. A Phase 1, Randomized, Observer-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study of an Epstein-Barr Virus (EBV) Candidate Vaccine, mRNA-1189, in 12- to 30-Year-Old Healthy Adolescents and Adults (Clinical trial registration No. NCT05164094). clinicaltrials.gov.
105. ModernaTX, Inc., 2023b. A Phase 1, Randomized, Observer-Blind, Placebo-Controlled, 2-Part, Dose-Ranging Study of an EBV Candidate Vaccine, mRNA-1195, in Healthy Adults 18 to 55 Years of Age (Clinical trial registration No. NCT05831111). clinicaltrials.gov.
106. Morris, M.C., Edmunds, W.J., Hesketh, L.M., Vyse, A.J., Miller, E., Morgan-Capner, P., Brown, D.W.G., 2002. Sero-epidemiological patterns of Epstein-Barr and herpes simplex (HSV-1 and HSV-2) viruses in England and Wales. *J. Med. Virol.* 67, 522–527. <https://doi.org/10.1002/jmv.10132>
107. Moutschen, M., Léonard, P., Sokal, E.M., Smets, F., Haumont, M., Mazzu, P., Bollen, A., Denamur, F., Peeters, P., Dubin, G., Denis, M., 2007. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* 25, 4697–4705. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.008>
108. Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V., Cooper, N.R., 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol.* 61, 1416–1420. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1416-1420.1987>
109. NIAID, 2023. Phase 1 Study of the Safety and Immunogenicity of an Epstein-Barr Virus (EBV)gp350- Ferritin Nanoparticle Vaccine in Healthy Adults With or Without EBV Infection (Clinical trial registration No. NCT04645147). clinicaltrials.gov.
110. Niederman, J.C., Evans, A.S., Subrahmanyam, L., McCollum, R.W., 1970. Prevalence, incidence and persistence of EB virus antibody in young adults. *N. Engl. J. Med.* 282, 361–365. <https://doi.org/10.1056/NEJM197002122820704>
111. Niens, M., Jarrett, R.F., Hepkema, B., Nolte, I.M., Diepstra, A., Platteel, M., Kouprie, N., Delury, C.P., Gallagher, A., Visser, L., Poppema, S., te Meerman, G.J., van den Berg, A., 2007. HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood* 110, 3310–3315. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-086934>
112. Opelz, G., Döhler, B., 2004. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 222–230. <https://doi.org/10.1046/j.1600-6143.2003.00325.x>
113. Paolucci, S., Cassaniti, I., Novazzi, F., Fiorina, L., Piralla, A., Comolli, G., Bruno, R., Maserati, R., Gulminetti, R., Novati, S., Mojoli, F., Baldanti, F., 2021. EBV DNA increase in COVID-19 patients with impaired lymphocyte subpopulation count. *Int. J. Infect. Dis.* 104, 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.051>
114. Paul, J.R., Bunnell, W.W., 1932. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med. Sci.* 267, 178–188. <https://doi.org/10.1097/00000441-197403000-00005>
115. Pavelka, J., 2014. Infekční mononukleóza – racionální přístup k diagnostice a léčbě. *Pediatr. praxi* 2014; 15(4): 191–193 3.

116. Peng, J., Chen, H.-L., Zhu, X.-B., Yang, G.-F., Zhang, Z.-L., Tian, Z.-Q., Pang, D.-W., 2011. Detection of Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas using quantum dot-based fluorescence in-situ hybridization. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 9725–9730. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5319>
117. Pfeiffer, L., 1889. Drüsenfieber. *Jahrb. f. Kinderheilk* 257–264.
118. Preciado, M.V., De Matteo, E., Diez, B., Menárguez, J., Grinstein, S., 1995. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood* 86, 3922–3929.
119. Quintanilla-Martínez, L., Gamboa-Domínguez, A., Gamez-Ledesma, I., Angeles-Angeles, A., Mohar, A., 1995. Association of Epstein-Barr virus latent membrane protein and Hodgkin's disease in Mexico. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 8, 675–679.
120. Rees, L., Tizard, E.J., Morgan, A.J., Cubitt, W.D., Finerty, S., Oyewole-Eletu, T.A., Owen, K., Royed, C., Stevens, S.J., Shroff, R.C., Tanday, M.K., Wilson, A.D., Middeldorp, J.M., Amlot, P.L., Steven, N.M., 2009. A phase I trial of epstein-barr virus gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation. *Transplantation* 88, 1025–1029. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b9d918>
121. Remington, J.S., Barnett, C.G., Meikel, M., Lunde, M.N., 1962. Toxoplasmosis and infectious mononucleosis. *Arch. Intern. Med.* 110, 744–753. <https://doi.org/10.1001/archinte.1962.03620230190026>
122. Roháčová, H., 2005. Onemocnění vyvolaná virem Epstein-Barrové. *Interní Med.*, 7 (6) 301–302.
123. Roubalová, K., 2010. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Med Praxi* 7, 241–244.
124. Roubalová, K., 2008. Materiály k postgraduálnímu kursu Virologie poskytnuté Národní referenční laboratoří pro herpetické viry. SZÚ, Praha.
125. Sausen, D.G., Bhutta, M.S., Gallo, E.S., Dahari, H., Borenstein, R., 2021. Stress-Induced Epstein-Barr Virus Reactivation. *Biomolecules* 11, 1380. <https://doi.org/10.3390/biom11091380>
126. Sebelin-Wulf, K., Nguyen, T.D., Oertel, S., Papp-Vary, M., Trappe, R.U., Schulzki, A., Pezzutto, A., Riess, H., Subklewe, M., 2007. Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl. Immunol.* 17, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2006.10.006>
127. Secondino, S., Canino, C., Alaimo, D., Muzzana, M., Galli, G., Borgetto, S., Basso, S., Bagnarino, J., Pulvirenti, C., Comoli, P., Pedrazzoli, P., 2023. Clinical Trials of Cellular Therapies in Solid Tumors. *Cancers* 15, 3667. <https://doi.org/10.3390/cancers15143667>
128. Secondino, S., Zecca, M., Licitra, L., Gurrado, A., Schiavetto, I., Bossi, P., Locati, L., Schiavo, R., Basso, S., Baldanti, F., Maccario, R., Locatelli, F., Siena, S., Pedrazzoli, P., Comoli, P., 2012. T-cell therapy for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: preparative lymphodepleting chemotherapy does not improve clinical results. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 23, 435–441. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr134>
129. Simonnet, A., Engelmann, I., Moreau, A.-S., Garcia, B., Six, S., El Kalioubie, A., Robriquet, L., Hober, D., Jourdain, M., 2021. High incidence of Epstein–Barr virus,

- cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis. Now* 51, 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.01.005>
130. Singh, V., Upadhyay, P., Reddy, J., Granger, J., 2021. SARS-CoV-2 respiratory co-infections: Incidence of viral and bacterial co-pathogens. *Int. J. Infect. Dis.* 105, 617–620. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.087>
 131. Šmardová, L., Vášová, I., Navrátil, M., Křenová, Z., Šálek, D., Marečková, A., Křen, L., Bolčák, K., Vorlíček, J., Mayer, J., 2008. Burkittův lymfom: přehled patofyziologie, diagnostiky a terapie. *Transfúze Hematol. Dnes* 14, 131–139.
 132. Smatti, M.K., Al-Sadeq, D.W., Ali, N.H., Pintus, G., Abou-Saleh, H., Nasrallah, G.K., 2018. Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* 8, 211. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
 133. Smets, F., Latinne, D., Bazin, H., Reding, R., Otte, J.-B., Buts, J.-P., Sokal, E.M., 2002. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 73, 1603–1610. <https://doi.org/10.1097/00007890-200205270-00014>
 134. Smíšková, D., 2012. Infekční mononukleóza a další onemocnění vyvolaná virem Epsteinova a Barrové. *Dermatol. praxi*, 6 (1) 23–25.
 135. Sokal, E.M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Léonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F., Denis, M., 2007. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 196, 1749–1753. <https://doi.org/10.1086/523813>
 136. Sprunt, T.P., Evans, F.A., 1920. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infections (“infectious mononucleosis”). *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 3.
 137. Staal, S.P., Ambinder, R., Beschorner, W.E., Hayward, G.S., Mann, R., 1989. A survey of Epstein-Barr virus DNA in lymphoid tissue. Frequent detection in Hodgkin’s disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 91, 1–5. <https://doi.org/10.1093/ajcp/91.1.1>
 138. Steeper, T.A., Horwitz, C.A., Ablashi, D.V., Salahuddin, S.Z., Saxinger, C., Saltzman, R., Schwartz, B., 1990. The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am. J. Clin. Pathol.* 93, 776–783. <https://doi.org/10.1093/ajcp/93.6.776>
 139. Steeper, T.A., Horwitz, C.A., Hanson, M., Henle, W., Henle, G., Rosenstein, H., Peterson, L., Amsden, T.W., Belzer, M., 1988. Heterophil-negative mononucleosis-like illnesses with atypical lymphocytosis in patients undergoing seroconversions to the human immunodeficiency virus. *Am. J. Clin. Pathol.* 90, 169–174. <https://doi.org/10.1093/ajcp/90.2.169>
 140. Stevens, S.J.C., Pronk, I., Middeldorp, J.M., 2001. Toward Standardization of Epstein-Barr Virus DNA Load Monitoring: Unfractionated Whole Blood as Preferred Clinical Specimen. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1211–1216. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1211-1216.2001>

141. Takeuchi, K., Tanaka-Taya, K., Kazuyama, Y., Ito, Y.M., Hashimoto, S., Fukayama, M., Mori, S., 2006. Prevalence of Epstein–Barr virus in Japan: Trends and future prediction. *Pathol. Int.* 56, 112–116. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01936.x>
142. Tang, M., Lautenberger, J.A., Gao, X., Sezgin, E., Hendrickson, S.L., Troyer, J.L., David, V.A., Guan, L., Mcintosh, C.E., Guo, X., Zheng, Y., Liao, J., Deng, H., Malasky, M., Kessing, B., Winkler, C.A., Carrington, M., de The, G., Zeng, Y., O'Brien, S.J., 2012. The Principal Genetic Determinants for Nasopharyngeal Carcinoma in China Involve the HLA Class I Antigen Recognition Groove. *PLoS Genet.* 8, e1003103. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003103>
143. Tang, M., Zeng, Y., Poisson, A., Marti, D., Guan, L., Zheng, Y., Deng, H., Liao, J., Guo, X., Sun, S., Nelson, G., de Thé, G., Winkler, C.A., O'Brien, S.J., Carrington, M., Gao, X., 2010. Haplotype-dependent HLA susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Southern Chinese population. *Genes Immun.* 11, 334–342. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.109>
144. Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., Kieff, E., 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203–213. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90216-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90216-9)
145. Tattevin, P., Le Tulzo, Y., Minjolle, S., Person, A., Chapplain, J.M., Arvieux, C., Thomas, R., Michelet, C., 2006. Increasing Incidence of Severe Epstein-Barr Virus-Related Infectious Mononucleosis: Surveillance Study. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1873–1874. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1873-1874.2006>
146. Thompson, M.P., Kurzrock, R., 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 803–821. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-0670-3>
147. Trottier, H., Buteau, C., Robitaille, N., Duval, M., Tucci, M., Lacroix, J., Alfieri, C., 2012. Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion (Paris)* 52, 2653–2663. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03611.x>
148. Tsai, W.S., Chang, M.H., Chen, J.Y., Lee, C.Y., Liu, Y.G., 1989. Seroepidemiological study of Epstein-Barr virus infection in children in Taipei. *Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi J. Zhonghua Minguo Xiao Er Ke Yi Xue Hui* 30, 81–86.
149. Tse, K.-P., Su, W.-H., Chang, K.-P., Tsang, N.-M., Yu, C.-J., Tang, P., See, L.-C., Hsueh, C., Yang, M.-L., Hao, S.-P., Li, H.-Y., Wang, M.-H., Liao, L.-P., Chen, L.-C., Lin, S.-R., Jorgensen, T.J., Chang, Y.-S., Shugart, Y.Y., 2009. Genome-wide Association Study Reveals Multiple Nasopharyngeal Carcinoma-Associated Loci within the HLA Region at Chromosome 6p21.3. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.07.007>
150. Urayama, K.Y., Jarrett, R.F., Hjalgrim, H., Diepstra, A., Kamatani, Y., Chabrier, A., Gaborieau, V., Boland, A., Nieters, A., Becker, N., Foretova, L., Benavente, Y., Maynadié, M., Staines, A., Shield, L., Lake, A., Montgomery, D., Taylor, M., Smedby, K.E., Amini, R.-M., Adami, H.-O., Glimelius, B., Feenstra, B., Nolte, I.M., Visser, L., van Imhoff, G.W., Lightfoot, T., Cocco, P., Kiemeny, L., Vermeulen, S.H., Holcatova, I., Vatten, L., Macfarlane, G.J., Thomson, P., Conway, D.I., Benhamou, S., Agudo, A., Healy, C.M., Overvad, K., Tjønneland, A., Melin, B., Canzian, F., Khaw, K.-T., Travis, R.C., Peeters, P.H.M., González, C.A., Quirós, J.R.,

- Sánchez, M.-J., Huerta, J.M., Ardanaz, E., Dorronsoro, M., Clavel-Chapelon, F., Bueno-de-Mesquita, H.B., Riboli, E., Roman, E., Boffetta, P., de Sanjosé, S., Zelenika, D., Melbye, M., van den Berg, A., Lathrop, M., Brennan, P., McKay, J.D., 2012. Genome-Wide Association Study of Classical Hodgkin Lymphoma and Epstein–Barr Virus Status–Defined Subgroups. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 104, 240–253. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr516>
151. ÚZIS ČR, 2013. Infekční nemoci 2013. ÚZIS ČR. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/infnem2013.pdf>.
 152. VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o., 2019. Seznam vyšetření - pracoviště virologie, Příl. 3 Laboratorní příručky, 2019. [online]. VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o. [cit. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://www.vidia-diagnostika.cz/laboratorni-vysetreni>.
 153. Votava, M., 2004. Serologická vyšetření a interpretace serologických nálezů. *Int. Med.* 75–79.
 154. Votava, M. et al., 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 978-80-902896-6-6.
 155. Wahren, B., Espmark, Å., Walldén, G., 1969. Serological Studies on Cytomegalovirus Infection in Relation to Infectious Mononucleosis and Similar Conditions. *Scand. J. Infect. Dis.* 1, 145–151. <https://doi.org/10.3109/inf.1969.1.issue-3.03>
 156. Wang, Y., Li, J., Ren, Y., Zhao, H., 2013. The levels of liver enzymes and atypical lymphocytes are higher in youth patients with infectious mononucleosis than in preschool children. *Clin. Mol. Hepatol.* 19, 382–388. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.4.382>
 157. Weinreb, M., Day, P.J., Niggli, F., Powell, J.E., Raafat, F., Hesseling, P.B., Schneider, J.W., Hartley, P.S., Tzortzatou-Stathopoulou, F., Khalek, E.R., Mangoud, A., El-Safy, U.R., Madanat, F., Al Sheyyab, M., Mpofo, C., Revesz, T., Rafii, R., Tiedemann, K., Waters, K.D., Barrantes, J.C., Nyongo, A., Riyat, M.S., Mann, J.R., 1996. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin’s disease from different geographical areas. *Arch. Dis. Child.* 74, 27–31.
 158. Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., Sklar, J., 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin’s disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 502–506. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902233200806>
 159. Weiss, L.M., Strickler, J.G., Warnke, R.A., Purtilo, D.T., Sklar, J., 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin’s disease. *Am. J. Pathol.* 129, 86–91.
 160. Zhou, X.G., Hamilton-Dutoit, S.J., Yan, Q.H., Pallesen, G., 1993. The association between Epstein-Barr virus and Chinese Hodgkin’s disease. *Int. J. Cancer* 55, 359–363. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910550303>
 161. Zubchenko, S., Kril, I., Nadizhko, O., Matsyura, O., Chopyak, V., 2022. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational study. *Rheumatol. Int.* 42, 1523–1530. <https://doi.org/10.1007/s00296-022-05146-9>
 162. zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., Santesson, L., 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056–1058. <https://doi.org/10.1038/2281056a0>