



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” ГР. ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО  
МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ**

Д-Р ЦВЕТЕЛИНА КОСТАДИНОВА ПОПОВА

СЕРОЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ И ЛАБОРАТОРНО ДИАГНОСТИЧНИ  
ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО И КЛИНИЧНАТА  
ЗНАЧИМОСТ НА EPSTEIN-BARR ВИРУСНАТА ИНФЕКЦИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“  
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ВИРУСОЛОГИЯ“ шифър 01.06.13

Научен ръководител:

Доц. д-р Лилия Иванова, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Радка Аргирова, д.м.н

Доц. Петя Генова-Калу, д.б.

Варна, 2017

Дисертационният труд съдържа 194 страници и е онагледен с 42 фигури и 31 таблици. Цитирани са 503 литературни източници, от които 6 на кирилица и 497 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по микробиология и вирусология на МУ- Варна на 12.10.2017 г. и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

Проф. д-р Радка Аргирова, д.м.н

Доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, д.м.

Доц. Петя Генова-Калу, д.б.

Доц. д-р Теменуга Стоева, д.м.

Доц. д-р Лилия Иванова, д.м.

Дисертантът работи като асистент в УС „Медицински лаборант“, МУ-Варна, МК – Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в библиотеката на МУ – Варна и на сайта на МУ-Варна <http://www.mu-varna.bg>.

## СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ .....	1
1. УВОД .....	3
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	5
3. МАТЕРИАЛИ, МЕТОДИ И ХИПОТЕЗИ .....	6
3.1 Материали. ....	6
3.2 Методи за изследване .....	7
1. Лабораторно-диагностични.....	7
1.1 Серологични методи. ....	7
1.2 Молекулярно биологични методи .....	8
2. Документален метод.....	8
3. Статистически методи. ....	8
3.3 Хипотези.....	8
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	9
4.1 Ретроспективно проучване върху честотата на EBV инфекция за периода 2010-2016 г.....	9
4.1.1 Динамика в EBV-серопревалентността на населението в Североизточна България в зависимост от наличието на anti-VCA IgG в ELISA. Резултати и обсъждане. ....	9
4.1.2 Възрастовото начало на първична EBV-инфекция в Североизточна България установено в ELISA anti-VCA IgM.....	14
4.1.3 Ретроспективен анализ на резултатите от изследването на anti-VCA IgM/ IgG при жените в репродуктивна възраст (15 г.- 49 г.) и децата до 1 г.....	20
4.2 Ретроспективен анализ на заболяванията асоциирани с EBV в Североизточна България за периода 2010-2016 г.....	22
4.2.1 Анализ на пациентите с диагноза ИМ.....	22
4.2.2 Анализ на пациентите с диагноза НХЛ.....	25
4.2.3 Анализ на пациентите с диагноза БХ.....	27
4.3 Проспективно изследване на потенциално рискови пациенти и пациенти с предполагаема първична инфекция. Приложение на различни серологични методи...	28
4.3.1 Приложение на ELISA anti-VCA IgG авидност.....	28
4.3.2 Приложение на тестовете за определяне на anti-EBNA1 IgG в ELISA.....	30
4.3.3 Приложение на тестове за доказване на anti-EA-(D) IgM и anti-EA-(D) IgG.....	35
4.3.4 Приложение на IgM Western blot анализ.....	40
4.4 Приложение на Real time PCR при рискови пациенти .....	43
4.4.1 Изследване на пациенти с ИМ в Real time PCR.....	43
4.4.2 Изследване на пациенти с различни видове лимфоми в Real time PCR.....	48
4.4.3 Изследване на други имunosупресирани пациенти в Real time PCR.....	56
5. ИЗВОДИ, ПРЕПОРЪКИ И ПРИНОСИ .....	61
6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	67
7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ.....	67
8. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ.....	68

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AI-антитяло индекс

EA-ранен антиген (early antigen)

EBNA- Епщайн –Бар нуклеарен антиген

EBV-Епщайн-Бар вирус (Epstein-Barr)

EIAs-имуно-ензимни методи

HCMV- цитомегаловирус

HSCT-трансплантация на хемопоетични стволови клетки

IFA-имунофлуоресцентен метод

LR -лимфоцитно преобладаване

MA-мембранен антиген

MC-смесен тип

NS-нодуларна склероза

PCR-полимеразна верижна реакция (Polymerase Chain Reaction)

PTLD-посттрансплантационни лимфопролиферативни заболявания

RU-релативни единици

SOT-трансплантация на солидни органи

VCA-вирусен капсиден антиген

WB- Western blot

БХ-болест на Ходжкин

ELISA-ензимно-свързан имуносорбентен тест

ИМ-инфекциозна мононуклеоза

ИС-имуносупресирани пациенти

ЛДХ-лактатдехидрогеназа

НХЛ-Неходжкинов лимфом

ОМЛ-остра миелоидна левкемия

ХЛЛ-хронична лимфоцитна левкемия

---

Експерименталната работа е извършена в Катедра „Микробиология и Вирусология” при МУ – Варна и УМБАЛ „Света Марина” – Варна.

В процеса на работа получихме ценна методична и практическа помощ от колегите, работещи в съответните звена.

## 1.УВОД

Въпреки предположенията за ролята на вирусите в развитието на ракови заболявания у хората, първи доказателства се получават едва след асоциирането на лимфома на Бъркит (БЛ) с новооткрит херпес – подобен вирус, наречен на откривателите си Epstein-Barr вирус (EBV). EBV е приет за първият човешки онкогенен вирус, доказан с помощта на електронна микроскопия в клетъчна линия от биопсичен материал на лимфом на дете от Африка през 1964 г. През следващите години интересът към EBV нараства. Медицинската и социалната му значимост се обуславят от широкото му разпространение и асоциирането му с редица заболявания, в това число и малигнени. Първичната инфекция в периода на юношеството се манифестира най-често с инфекциозна мононуклеоза (ИМ), докато в ранното детство по-често е безсимптомна или с нетипична клинична симптоматика. Голямо значение за клиничната практика има диагностиката на EBV инфекцията и възможностите за нейното подобряване. Това включва определяне на подходящите методи и маркерите при остра инфекция и реактивация, както и при конкретните неопластични заболявания, в зависимост от имунния статус на пациента. Основно диагностиката е серологична базирана на имуноензимни методи (EIA) за определяне на вирус специфични антитела. В лабораториите в България се използва преди всичко определяне на EBV специфични anti-VCA IgM и IgG. Първите се появяват при остра инфекция, а вторите остават да персистират пожизнено и са основен маркер за определяне на серопревалентността сред популацията. В организма на пациента обаче се образуват антитела и срещу други вирусни антигени. Освен това комбинацията от антитела при различните пациенти може да варира, което да затрудни установяване на първична инфекция. Това налага въвеждането и на други маркери и методи в подкрепа на клиничната диагноза.

Като представител на семейството на херпесните вируси за EBV е характерно персистирането в човешкия организъм след първична инфекция, с възможности за реактивация, особено при имунокомпрометирани и имunosупресирани пациенти. В настояще време тези пациенти са във фокуса на медицинската общност поради факта, че броят им се увеличава и поради риска от развитие на опортюнистични инфекции, реактивиране на вирусни инфекции, развитие на лимфоми и др. Реактивацията на EBV е периодично явление дори при имунокомпетентни индивиди, което има значение за широкото му разпространение в човешката популация, но при имунокомпрометирани пациенти може да доведе до сериозни животозастрашаващи състояния. Именно вирусната реактивация остава основно предизвикателство за лабораторната диагностика. Въпреки многото проучвания все още липсват единни критерии за нейното регистриране. За сега се приема, че полимеразна-верижната реакция (PCR), особено при имунокомпрометирани пациенти може да даде добра информация подпомагаща клиничната диагноза, както и да покаже участието на вируса в развитието на онкогенни заболявания.

EBV е с доказано участието в развитието на лимфопролиферативни заболявания (PTLD) след трансплантации на хемопоеични стволови клетки и органи. Въпреки малката им честота те стават клинично значими поради разширяването на трансплантационната медицина, използване на несвързани и несъответстващи донори и

високият риск от фатален край. Развитието на трансплантологията изисква определяне на критериите за оценка на риска от реактивация на латентни вирусни инфекции, в това число EBV, и последиците от първична инфекция (преди всичко от донора) и реинфекция. Насочените изследвания могат да идентифицират рисковите пациенти и да прогнозират и предотвратят развитието на PTLD.

В резултат на множество проучвания EBV е асоцииран с редица онкогенни заболявания при хората. Някои от тях са със съпътстваща генетична генеза и географски рестриктирани, като назофарингеален карцином (НФК) и ендемичния лимфом на Бъркит (БЛ). Други заболявания като лимфом на Ходжкин (БХ), неходжкинови лимфоми (НХЛ) се срещат с по-голяма честота в Европа и Америка. По данни от Националния регистър за 2015 г., с БХ в България са диагностицирани 106 нови случая. Случаите с диагностицирани неходжкинови лимфоми са 429. В „Методични насоки за диагностика и лечение на хематологични заболявания“ на българското медицинско сдружение по хематология от 2015 г. не е включено изследване за участието на EBV при тези групи пациенти. В тази насока изследванията за установяване на неговата роля могат да подпомогнат по-пълното уточняване на патогенезата и разработване на терапевтична стратегия.

## 2. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

### Цел на изследването:

Дефиниране на сероепидемиологичния статус на населението в Североизточна България и установяване относителния дял на възрастово свързаното разпространение на остра Epstein-Barr вирусна инфекция. Дефиниране диагностичните възможности за доказване остра вирусна инфекция и реактивация на инфекцията при рискови пациенти.

### Задачи на изследването:

- I. Да се установи серопревалентността на населението в Североизточна България за периода 2010 г. - 2016 г.:
  1. Да се установи разпространението на EBV-инфекцията според носителството на anti –EBV-CA IgG в ELISA сред населението в Североизточна България за периода 2010 г. - 2016 г.
  2. Да се установи възрастовото начало на първична EBV инфекция въз основа на наличие в ELISA на anti-EBV-CA IgM антитела сред населението в Североизточна България за периода 2010 г. - 2016 г.
  3. Да се сравнят данните от приложените тестове.
  4. Да се дефинират и анализират най-честите заболявания асоциирани с EBV за същия период в същия регион.
- II. Да се разработи диагностичен алгоритъм за подобряване лабораторната диагностика на острата EBV - инфекция:
  1. Проспективно да се анализира специфичния имунен отговор при пациенти с EBV асоциирани остри заболявания и да се дефинират възможните серологични профили.
  2. Да се уточнят диагностичните възможности на 4 комерсиални ELISA(anti-EA(D)IgM, anti-EA(D) IgG, anti-EBNA-1IgG, авидност на anti-VCA IgG ) и Western blot анализ при пациенти с EBV асоциирани остри заболявания и различни серологични профили.
  3. Да се съпоставят резултатите получени в различните тестове и да се създаде диагностичен алгоритъм за установяване на първична EBV инфекция.
- III. Да се проучи ролята на EBV при имunosупресирани пациенти и пациенти с различни видове лимфоми, и възможностите на специфичните лабораторни методи за дефиниране на реактивация:
  1. Да се изследват плазмени проби на пациенти с инфекциозна мононуклеоза за наличие на EBV ДНК в Real time PCR и да се сравнят резултатите с тези от серологичните изследвания и от изследванията на целевите групи в PCR.
  2. Да се изследват плазмени проби на пациенти с Болест на Ходжкин, Неходжкинови лимфоми и други имunosупресирани пациенти за определяне на специфичен имунен отговор в ELISA (anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EA(D)IgM, anti-EA(D)IgG, anti-EBNA-1IgG).
  3. Да се изследват плазмени проби от пациенти с Болест на Ходжкин, Неходжкинови лимфоми и други имunosупресирани пациенти за наличие на EBV ДНК в Real time PCR и да се сравнят резултатите с тези от серологичните изследвания.
  4. Да се направи сравнителен анализ и оценка на използваните методи и да се формулират критерии за дефиниране на вирусна реактивация при потенциално рискови пациенти.



### **3. МАТЕРИАЛИ, МЕТОДИ И ХИПОТЕЗИ:**

#### **3.1 Материали:**

Настоящият дисертационен труд включва анализиране на проби от пациенти изследвани за Epstein-Barr вирусна инфекция (EBV). Изследванията са осъществени във вирусологична лаборатория на УМБАЛ „Св. Марина“. Проучването е извършено в два етапа:

##### *3.1.1 Ретроспективно изследване:*

Общо 5957 единични серумни проби от гр. Варна и областта са изследвани за наличие на anti-EBV-CA IgG и 5961 - за наличие на anti-EBV-CA IgM в периода 2010-2016 г. Възрастовият диапазон на изследваните варира от 1 м. до 89 г., разпределени в 16 възрастови групи.

За анализиране честотата на заболявания асоциирани с EBV изследвахме 746 пациенти с ИМ, 41 пациенти с БХ и 120 пациенти - с НХЛ.

Критерии за включване:

- Наличие на серологичен резултат за един от двата anti-EBV-CA маркера IgM и/или IgG;
- Да притежават всички данни необходими за статистическата обработка;

Критерии за изключване:

- Пациенти с неопределени резултати;
- Пациенти без данни за статистическата обработка;

Серумните проби за определяне на серопревалентност и времето на първична инфекция са вземани от медицински специалисти от съответните отделения и предоставени от ръководителят на вирусологична лаборатория за анализиране на резултатите при спазване на конфиденциалността.

##### *3.1.2 Проспективно изследване:*

Изследвани са общо 126 серумни/плазмени проби на пациенти с вероятна първична инфекция, вирусна реактивация или заболявания асоциирани с EBV в 4 комерсиални ELISA (anti-EBNA1 IgG, anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG, anti-EBV-CA IgG (авидност) и IgM WB анализ.

Изследвани са общо 169 плазмени проби в Real time PCR за определяне EBV ДНК репликация. От тях 17 проби от пациенти с болест на Ходжкин, 52 - с Неходжкинови лимфоми, 33 имуносупресирани пациенти от клиниката по хематология и 17 бъбречно трансплантирани пациенти на имуносупресивна терапия от клиниката по нефрология при УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна. От клиниката по хематология при УМБАЛ „Г. Странски“- Плевен са предоставени 10 проби от лица с болест на Ходжкин. Изследвани са 40 проби на пациенти с клиничко-лабораторни данни за инфекциозна моноклеоза (ИМ) от клиниката по инфекциозни болести на УМБАЛ „Св. Марина“- Варна. Плазмените проби са събирани във вакутейнери с EDTA.

Критерии за включване:

- Пациенти, изследвани за EBV по повод на диагностично уточняване;
- Имуносупресирани пациенти, в това число и трансплантирани;
- Пациенти с инфекциозна моноклеоза;
- Пациенти с диагноза Ходжкинови и Неходжкинови лимфоми;

Критерии за изключване:

- Пациенти без пълни данни необходими за извършване на статистическото проучване;
- Пациенти, които са отказали участие;
- Пациенти извън целевата група.

Пол, възраст и населено място не са критерии за изключване.

Пробите на лицата събирани за проспективното изследване са вземани от специалистите, които са членове на изследователския екип, след предоставено информирано съгласие. Пробите отговаряха на критериите за лабораторна диагностика, без хемолиза, нелипемични и неиктерични. Изследванията за доказване наличие на anti-EBV-CA IgM и anti-EBV-CA IgG се изработваха в рамките на една седмица. За останалите маркери и методи пробите се съхраняваха на -20 до -60° C в аликвоти без да се допуска многократно замразяване и размразяване.

### **3.2 Методи:**

#### *1. Лабораторно-диагностични методи:*

##### **1.1 Серологични методи:**

Пробите за определяне на серопревалентност и начало на първична инфекция са изработени в ELISA, индиректен вариант, с търговски стандартизирани китове в 96 ямкови плаки на фирма EUROIMMUN-GERMANY. Всички проби в проспективното проучване са първично скринирани за наличие на anti-VCA ELISA IgM и anti-EBV-CA ELISA IgG.

При пациенти с диагнози асоциирани с EBV и имunosупресирани използвахме индиректна ELISA за установяване на антитела срещу EBV early antigen diffuse (EA-D) IgM и IgG и антитела срещу EBV nuclear antigen-1 IgG (anti-EBNA1 IgG).

При отчитане на резултатите използвахме полуколичествения метод за IgM с изчисляване на  $AI = \text{Extinction of the sample} / \text{Extinction of calibrator}$ . Положителните проби са с  $\text{ratio} > 1.1$ , отрицателните с  $\text{ratio} < 0.8$ . и проби между 0.8 и 1.1 се считат за borderline (гранични).

При отчитане на резултатите за IgG използвахме калибраторни криви от трите калибратора (Cal 1=200 RU/ml, Cal 2=20 RU/ml, Cal 3=2 RU/ml) за изчисляване на RU/ml. Отчитане на пробите е както следва: положителни резултат  $\geq 22$  RU/ml; отрицателен резултат  $< 16$  RU/ml; borderline (гранични)  $\geq 16 < 22$  RU/ml.

При първичното тестиране се подбраха проби с възможност от неточна интерпретация на базата на основните маркери. Те се тестваха за авидност на IgG срещу VCA и по Western blot за IgM. За авидност използвахме тестове на фирма EUROIMMUN-GERMANY. Изчисляване на релативния авидити индекс в % (RAI%) става чрез разделяне на екстинкцията на пробата третирана с урея и пробата без урея  $\times 100$ . Интерпретацията на резултатите е както следва: RAI < 40% - ниска авидност; RAI 40%-60% - неопределени; RAI > 60% - висока авидност.

Western-blot анализ се осъществи в тест EUROLINE Anti-EBV PROFILE 2 (IgM), също на фирма EUROIMMUN-GERMANY. Тестът е качествен и служи за детекция на антитела от клас IgM към 5 различни EBV антигена- VCA gp125, VCA p19, EBNA-1, p22 и EA-D в серум или плазма. Антигените са рекомбинантни или нативни (VCA gp125), високо пречистени за диференциране на остра и минала инфекция с вируса в една проба. Отчитане на резултатите направихме с EUROLineScan software с код EBV2.1 EL\_IgM. Положителните проби имат поне един VCA банд умерено или силно положителен. Отрицателни са пробите, при които и двата VCA банд са негативни. Слабо позитивните интерпретирахме като неопределени.

### 1.2. Молекулярно-биологични методи -PCR (polymerase chain reaction)

За екстракция и амплификация използвахме тест EBV Real-TM Quant на фирма Sacase. Тестът е за качествена или количествена детекция на EBV в серум/плазма и други биологични материали. От биологичния материал се екстрахира вирусната ДНК, след което се амплифицира и се доказва чрез сонда специфична за EBV с флуоресцентно багрило, Internal control (IC) и ендогенен IC glob (b-globine gene). Таргетния регион е LMP-гена. Чувствителността на теста е от 200 copies/ ml или 5 копия на EBV ДНК на  $10^5$  клетки. Линейният диапазон е 500 - 10 000 000 EBV ДНК copies / ml.

Отчитането се извърши по следната формула:

$EBV\ DNA\ copies/reaction / IC\ DNA\ copies/reaction \times IC\ coefficient = copies\ EBV/ml$

Коефициент е специфичен за всяка партида и е отбелязан в TM Quant карта на EBV. В нашият тест коефициентът е 60000.

#### 2.Документален метод:

Събрани са данни от медицинската документация на пациентите изследвани в Real time PCR за други клиничко-лабораторни показатели, клиничен стадий на инфекцията и хистологичния вариант.

#### 3. Статистически методи:

За оценка на зависимостите използвахме „Chi square test“, „Spearman's rank correlation“ и тест на Fisher. Констатираните различия са приети за статистически значими, потвърждаващи алтернативната хипотеза при  $p < 0.05$ . Статистическата обработка на данните е направена с помощта на статистически пакет SPSS vs 23, от където изведохме: показатели за относителен дял (%); средна възраст ( $SD \pm$ ); интервалите на доверителност (95%CI); средна аритметична стойност на изследваните величини (mean)  $\pm$  стандартно отклонение (SD).

### 3.3 Хипотези

1. В Североизточна България заразеността на населението по литературни данни достига 80%. Най-често първичното заразяване става в ранна детска възраст. Това предполага по-висока честота на реактивация на вируса в по-късна възраст при пациенти с малигнени заболявания, под имunosупресия и след трансплантация.

2. Преобладаващо във вирусологичните лаборатории се използва ELISA за наличие на anti-EBV-CA IgM и IgG. Използваните серологични методи и маркери са достатъчни за установяване на първична инфекция и реактивация на Epstein-Barr вирусната инфекция.

3. EBV е онкогенен вирус и участва в развитието на Ходжкинови и Неходжкинови лимфоми. Участието на вируса може да се установи с приложение на молекулярно-биологични методи (Real time PCR).

## 4.РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 4.1 Ретроспективно проучване върху честотата на EBV инфекция за периода 2010-2016 г.

#### 4.1.1 Динамика в EBV-серопревалентността на населението в Североизточна България в зависимост от наличието на anti-VCA IgG в ELISA. Резултати и обсъждане.

Установяването на серопревалентността има важно епидемиологично значение, което се обуславя от възможността вирусът да персистира пожизнено в заразените индивиди, да се реактивира периодично, и да причинява сериозни усложнения, най-вече при имунокомпрометирани и имunosупресирани пациенти.

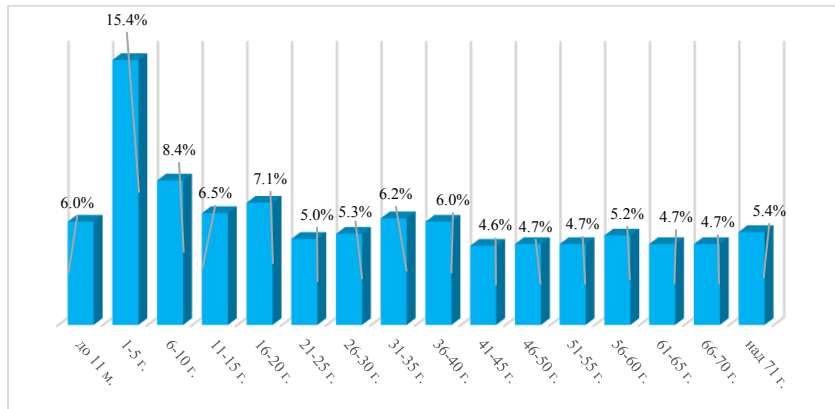
Настоящото проучване обхваща периода 2010 г. - 2016 г. с изследване на 5957 лица за наличие на anti-VCA IgG. Най-малко са изследваните лица в първата година на визирания период. В следващите години интересът към EBV нараства, вероятно дължащо се на по-добрата информираност на лекарите, по-често използване на специфичните тестове за диагностика и увеличаване на случаите, суспектни за инфекция с него. Средната възраст на изследваните е 30.25 г. ( $SD\pm 23.94$ ), мода (Mo) - 2 г. и медиана (Me) - 27 години. При жените е по-висока - 32.00 ( $SD\pm 23.85$ ), за разлика от мъжете - 28.82 ( $SD\pm 23.93$ ).

Изследваните лица са разположени в широк възрастов диапазон – от 1 месец до 89 години и са разпределени в 16 групи, от които четиринадесет с еднаква ширина и две с нефиксирана ширина (първата и последната), включващи екстремните стойности във вариационния ред на възрастта. Относителният дял (54.9%; 95%CI: 53.6%-56.1%, n=3269) на изследваните мъже е по-висок от относителния дял (45.1%; 95%CI: 43.9%-46.4%, n=2688) на изследваните жени, което може да се дължи на по-често асоцииране на заболявания причинени от EBV при мъжете, по-често търсене на лекарска консултация или по-чести хоспитализации. Мъжете преобладават през всички години включени в изследването.

Относителният дял (87.6%; 95%CI: 86.8%-88.5%, n=5221) на хоспитализираните пациенти е по-висок от относителния дял на амбулаторните пациенти (12.4%, 95%CI: 11.5%-13.2%, n=736).

В анализа най-често са представени лицата от възрастова група (1 г.-5 г.). Причината за превалиращия относителен дял на изследваните лица се дължи на по-честата необходимост от консултация и лабораторно-диагностично уточняване на нетипични клинични прояви при малки деца, както и очаквана първична инфекция на база на предходни проучвания. Следват децата в предучилищна и училищна възраст. Това разпределение на изследваните лица съответства на по-високия риск от инфектиране с EBV, отложено в ранното детство, с развитие на ИМ със суспектна клинична симптоматика, изискваща потвърдително изследване. В по-големите възрастови групи обхванатите в изследване са по-малко, вероятно поради асоцииране на EBV инфекцията основно с ИМ или очакваното носителство на вируса в тази група (Фиг.1).

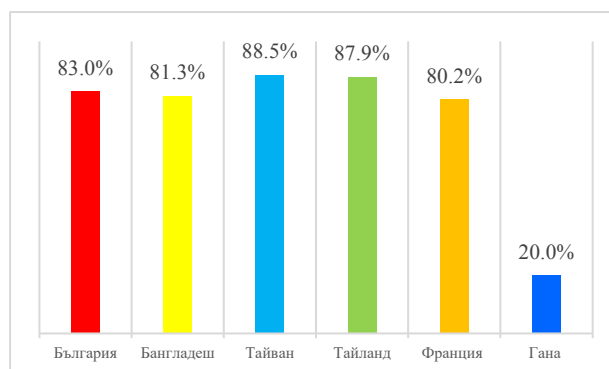
**Фигура 1. Относителен дял на изследваните в теста anti-VCA IgG лица в зависимост от възрастта**



Общата серопозитивност, установена при изследваните лица в ELISA anti -VCA IgG е 83.0% (95%CI:82.0%-83.9%, n=4943). Данните ни се доближават до описаните в проучване на Генова П. и сътр. (2013), обхващащо периода 2009 г. - 2011 г. С доказана серопозитивност в 79.0%. Изследвани са 552 серумни проби от нехоспитализирани пациенти във възрастов диапазон 6 м. - 80 г. Предходно проучване за Североизточна България на Ivanova L. (2000) определя средното разпространение на anti-EBV в CFT 44.6% и 60.8% в IFA, в значително по-малка извадка. Нашите данни показват динамика в серопревалентността сред населението на Североизточна България в сравнение с предишните изследвания, което може да се дължи както на по-големия брой на участници с преобладаване на хоспитализирани пациенти, средната възраст на извадката, така и на избор на метод и маркер.

Нашите данни потвърждават широкото разпространение на вируса, което е в съответствие и със световните проучвания. В много публикации се съобщава за серопозитивност между 90% и 95% при възрастното население. Изненадващо ниска обща серопревалентност се съобщава от Adjei A. et al. (2008) за здрави HIV негативни кръвни донори в Гана във възрастов диапазон 18 г. – 65 г. (20.0%) (Фиг.2).

**Фигура 2. Сравнително представяне на средната серопревалентност в различни региони**



В групата на амбулаторните пациенти (n=736) относителният дял на anti-VCA

IgG-серопозитивните лица е 88.3% (95%CI:85.8%-90.5%, n=650), а на хоспитализираните 82.2% (95%CI:81.3%-83.3%, n=4293). Връзката в серопозитивността по тип на пациента е статистически значима ( $p < 0.05$ ), но слаба установена с тест на Cramer's  $V = 0.053$ . В близко като дизайн на нашето проучване, но с анализиране на много по-голям брой данни от изследвани пациенти е правено в Гренобъл, Франция. Авторите са установили 88.3% серопозитивност при хоспитализирани пациенти и 82.0% при амбулаторни такива (Fourcade G. et al. 2017), обратно на резултатите, които ние получихме. Допускаме, че причината е средната възраст, която при нашите хоспитализирани пациенти е (33.7 г.), с малка разлика от тази на амбулаторните пациенти (35.1 г.). В проучването от Гренобъл хоспитализираните пациенти имат значително по-висока средна възраст (42.0 г.), спрямо 30.0 г. при амбулаторните.

Серопозитивността по години в изследвания период е представена на таблица 1. През 2011 г. и 2012 г. относителният дял на серопозитивните лица е под установения среден относителен дял за целия период на изследването.

**Таблица 1. Брой и относителен дял на anti-VCA IgG серопозитивните лица по години**

Година на изследване	Anti-VCA IgG – серопозитивен статус		
	N*	N**	Относителен дял %, (95%CI)
2010	638	544	85.3% (82.3%-87.9%)
2011	842	656	77.9% (75.0%-80.7%)
2012	927	726	78.3% (75.5%-80.9%)
2013	863	728	84.4% (81.8%-86.7%)
2014	903	758	83.9% (81.4%-86.3%)
2015	839	723	86.2% (83.7%-88.4%)
2016	945	808	85.5% (83.1%-87.7%)
<b>Общо</b>	5957	4943	83.0% (82.0%-83.9%)

*N\** -брой на изследваните лица за наличие на anti-VCA IgG за съответната година

*N\*\** брой на anti-VCA IgG-серопозитивните лица за съответната година

*Възrastова и полово-свързана характеристика на anti-VCA IgG серопозитивността през анализирания период в Североизточна България.*

Анализът на резултатите показва най-ниска степен на серопозитивност във възрастова група 1 г. – 5 г., като 51.4% (95%CI:48.1%-54.7%) от изследваните деца са anti-VCA IgG положителни. С напредване на възрастта относителният дял на позитивните бързо нараства, като във възрастова група 6 г. - 10 г. е 73.8%. След този период нарастването е по-плавно. В групите над 26 годишна възраст позитивността е над 93% и съответства на световните тенденции. Средната възраст на положителните за anti-VCA IgG е 33.86 (SD±23.44) (Табл.2).

**Таблица 2. Възrastова характеристика на разпространението на anti-VCA IgG в Североизточна България**

Възrastова група	N*	Anti-VCA IgG серопозитивност	
		N**	Относителен дял %, (95%CI)
Под 1 г.	358	247	69.0% (63.9%-73.8%)
1-5 г.	916	471	51.4% (48.1%-54.7%)

6-10 г.	500	369	73.8% (69.7%-77.6%)
11-15 г.	390	322	82.6% (78.4%-86.2%)
16-20 г.	420	355	84.5% (80.7%-87.8%)
21-25 г.	300	266	88.7% (84.5%-92.0%)
26-30 г.	315	295	93.7% (90.4%-96.1%)
31-35 г.	367	344	93.7% (90.7%-96.0%)
36-40 г.	358	341	95.3% (92.5%-97.2%)
41-45 г.	277	264	95.3% (92.1%-97.5%)
46-50 г.	279	262	93.9% (90.4%-96.4%)
51-55 г.	279	262	93.9% (90.4%-96.4%)
56-60 г.	312	312	95.5% (92.6%-97.5%)
61-65 г.	281	266	94.7% (91.3%-97.0%)
66-70 г.	282	273	96.8% (94.0%-98.5%)
Над 71 г.	323	308	95.4% (92.5%-97.4%)
Общо	5957	4943	83.0% (82.0%-83.9%)

*N\** Брой на изследваните лица за наличие на anti-VCA Ig G от съответната възрастова група

*N\*\** Брой на anti-VCA IgG -серопозитивните лица от съответната възрастова група

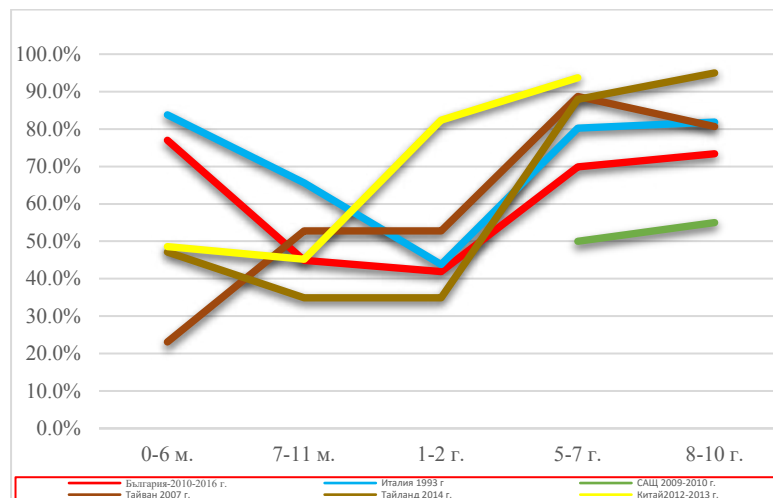
Чрез Chi-square тест установихме статистически значима връзка между възрастта на изследваните лица и anti-VCA IgG серопозитивността ( $p < 0.05$ ), силата е средна (Cramer's  $V = 0.418$ ).

Анализирайки литературните източници установихме, че повечето от проучванията са правени в определени възрастови групи с цел доказване значението на възрастта като основна детерминанта за заразяване с EBV. Данните от проучването ни потвърждават световните тенденции за увеличаване на серопозитивността с напредване на възрастта. Много автори посочват, че разпространението на EBV сред възрастното население е във всички общества (развити и развиващи се). При сравняване на нашите данни с тези от предходно проучване, установихме същата тенденция. Относителния дял на серопозитивните деца на 3 г. установен от Ivanova L. (2000) е 50%, последвано от бързо увеличаване във възрастови групи 4 г. - 7 г. (65%) и 15 г. - 18 г. (80%). Във възрастова група 51 г. - 60 г. достига 85%. Изследователски екип от Турция установява близка до нашата серопозитивност при възрастното население (89.5%). Данните за серопозитивността при децата и юношите до 18 г. (63.3%) е по-ниска от установената при нас за този възрастов период (Karadag A. et al. 2014). Следователно в съседна Турция заразяването продължава до по-късна възраст.

При сравняване на нашите данни с тези от региони, за които има публикувана информация (Фиг.3), всички представят тенденцията на повишаване на серопозитивността с възрастта, но се отчитат значителни разлики в относителните дялове в различните региони на света, обусловено от различното време на първична инфекция. Нашите данни във възрастовите групи до 10 г. са по-близки до установените от Leogrande, G., (1993) при деца в Италия, като регистрираме по-ниско носителство на IgG при бебетата и по-плавно нарастване в серопозитивността след 2 годишна възраст. От всички представени държави единствено по-ниска серопозитивност от нашата в групата на подрастващите регистрират в САЩ, където вероятно първичното заразяване е изместено към по-високите възрасти. Заразяването с EBV в нашата страна продължава и след 20 годишна възраст за разлика от публикуваните в повечето проучвания данни за

достигане на серопревалентност над 90% до 19 годишна възраст.

**Фигура 3. Сравнително представяне на динамиката в серопревалентността в Североизточна България с 6 държави за различни периоди в групите от 0 до 10 г.**



В две проучвания се съобщава за намаляване на относителните дялове на серопозитивните лица в по-младите възрасти, съпоставено с предходни периоди. Това най-вероятно според авторите Takeuchi K. et al. (2006) и Balfour H et al. (2013) е свързано с подобряване на социално-икономическия стандарт. Нашите данни по относителни дялове на положителните лица във възрастовите групи и годините на изследване не показват никакви трайни тенденции. Във възрастова група 6 г. – 10 г. в нашето проучване относителният дял на положителните е 66.3% през 2016 г., и е значително по-нисък от този през 2010 г. (82.9%). В годините между 2011 г. и 2015 г. относителният дял варира между 68% и 78%. В контраст с тези наблюдения, във възрастова група 1 г. - 5 г. установихме постепенно увеличаване на относителните дялове на положителните деца от 48.4% до 54.5%. Подобно увеличаване наблюдаваме и във възрастова група 16 г. - 20 г. - от 81.8% до 93.8%, с известни колебания в периода 2012 г. - 2015 г. Динамиката в серопревалентността вероятно е отражение на продължаващото заразяване след 20 годишна възраст, а според някои автори значим фактор е промяна в числеността на семействата (Xiong G. et al. 2014).

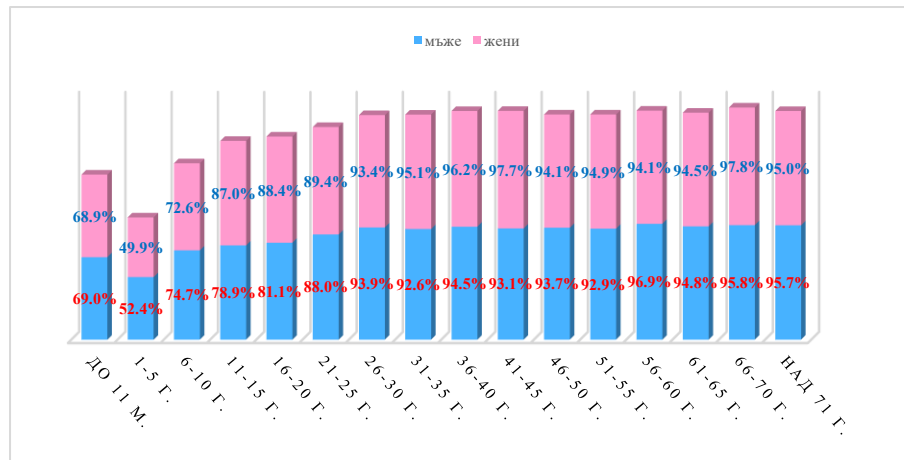
В групата на изследваните жени ( $n=2688$ ), относителния дял (84.8%, 95%CI:83.4%-86.2%,  $n=2280$ ) на anti-VCA IgG-серопозитивните превалява над относителния дял на положителните мъже - 81.5% (95%CI:80.1%-82.8%,  $n=2663$ ), ( $p<0.05$ ).

Средната възраст на серопозитивните лица от мъжки пол е 32.62 години ( $SD\pm 23.64$ ) и е по-ниска от средната възраст 35.31 ( $SD\pm 23.13$ ) на серопозитивните лица от женски пол, което може да обясни разликите в относителните дялове.

Разпределението на положителните мъже и жени по възрастови групи е представено на фигура 4. Разликите в зависимост от пола са по-изразени в по-малките възрастови групи и това вероятно е обусловено от времето за първична инфекция при момчетата и момичетата.



**Фигура 4. Относителен дял на положителните мъже и жени в зависимост от възрастта**



Нашите данни не корелират с установените в други региони на България от Генова и сътр. (2015), които посочват съотношение мъже/жени 2:1, но корелират с данни от други проучвания (Crawford DH. et al. 2006; Higgins C. et al. 2007; Dowd J. et al. 2013).

В заключение установихме висока честота на разпространение на EBV сред нашата популация, в синхрон със световните тенденции. Позитивността за anti-VCA IgG е възрастово обусловена, като над 93% от лицата над 26 г. са вече заразени с вируса.

#### 4.1.2 Възрастовото начало на първична EBV-инфекция в Североизточна България установено в ELISA anti-VCA IgM

В ELISA anti-VCA IgM са тествани 5961 лица. Разпределението по пол показва преваляване на мъжете 55.0% (95% CI: 53.7% - 56.3%, n=3279) спрямо изследваните жени 45.0% (95% CI: 43.7% - 46.3%, n=2682). Делът на хоспитализираните пациенти е 87.9% (95% CI: 87.1% - 88.8%, n=5242) и значително превишава делът на амбулаторно изследваните - 12.1% (95% CI: 11.2% - 12.9%, n=719). Разпределението на изследваните пациенти по възрастови групи следва модела описан в представения по-горе анализ.

Според нашите данни болшинството от изследваните деца до 1 годишна възраст 98.9% (95% CI: 97.2% - 99.7%, n=356) са хоспитализирани. В по-големите възрастови групи относителният дял на хоспитализираните намалява. В периода 16 г. - 20 г. относителният дял на амбулаторните пациенти е 15.0%. В тази възраст според литературата се очаква най-честа клинична манифестация на ИМ. Следователно в доболничната помощ също се търси и мисли за първична EBV-инфекция, като тя не винаги е повод за хоспитализация. Най-голям е делът на изследваните амбулаторните пациенти между 21 г. и 40 г. С напредване на възрастта, поради зачестяване на хоспитализациите по различни поводи, преобладават изследванията на хоспитализираните пациенти. В по-големите възрастови групи, които имат по-малък относителен дял в нашето проучване, обичайно се търси реактивация на вирусната инфекция и зачестяват случаите на някои други асоциирани с EBV заболявания.

Положителен резултат установихме при общо 990 от изследваните лица - 16.6% (95%

CI:15.7% - 17.6%). Това са 15.3% (95% CI:12.7% - 18.1%, n=110) от амбулаторно изследваните пациенти и 16.8% (95% CI:15.8% - 17.8%, n=880) от хоспитализираните (p>0.05). При сравняване с резултатите получени в ELISA anti-VCA IgG, първична инфекция се доказва по-често при хоспитализираните пациенти, макар и разликите и в двата случая да са малки. Средната възраст на положителните в anti-VCA IgM лица е 16.68 (SD±17.43) и е сигнификантно по-ниска от доказаната позитивност в anti-VCA IgG (p<0.05).

При сравнителен анализ между типа пациенти, възрастовата група и положителният резултат от изследване на anti-VCA IgM установихме най-висок относителен дял положителни амбулаторни пациенти в групата на 21 г. - 25 г. (42.6%). Това е в съответствие с нашите данни от изследванията за серопревалентност в общата популация, които ни показват, че в нашия регион заразяването с EBV продължава и след 20 г. възраст. В тази възраст първичната инфекция с вируса също се асоциира с клинична картина на ИМ при част от новозаразените лица. Вероятно не се очаква да се случва с честотата, наблюдавана в юношеския период, поради което хоспитализации се провеждат по-рядко.

Динамиката в anti-VCA IgM позитивността и годините включени в анализирания период са представени на таблица 3.

**Таблица 3. Брой и относителен дял на положителни за anti-VCA IgM според годината на изследване**

Година на изследване	Anti-VCA IgM – серопозитивен статус		
	N*	N**	Относителен дял %, (95%CI)
2010	641	123	19.2%(16.2%-22.5%)
2011	834	127	15.2%(12.9%-17.8%)
2012	923	137	14.8%(12.6%-17.3%)
2013	851	170	20.0%(17.3%-22.8%)
2014	903	176	19.5%(17.0%-22.2%)
2015	832	143	17.2%(14.7%-19.9%)
2016	977	114	11.7%(9.7%-13.8%)
<b>Общо</b>	5961	990	16.6%(15.7%-17.6%)

N\*-общ брой изследвани по години

N\*\*-положителни на anti-EBV-VCA IgM по години

Не съществуват данни от предходни проучвания за България, които да ни позволят да определим тенденцията в модела на първично заразяване. Като съпоставим нашите данни, най-висока anti-VCA IgM серопозитивност отчитаме през 2013 г. (20.0%). След този период процента на серопозитивните в годините намалява, като най-изразено намаляване наблюдавахме през 2016 г. - с около 8%. Вероятно това се дължи на по-добрата информираност на населението и спазване на по-добри санитарно-хигиенни навици, но само бъдещо проучване и наблюдение на популацията може да очертае тенденции и да анализира влиянието на социално-икономическите фактори, които също имат значение за периода на първичното инфектиране.

#### *Възрастово и полово-свързано разпространение на anti-VCA IgM*

Според нашите данни първичното заразяване става най-често в периода 1 г. - 5 г. и 16 г.- 20 г. с незначителни разлики в групите от ранна училищна възраст. Наличие на деца с положителни проби под една година показва, че заразяването започва в ранното

детство, след изчерпване на протективните майчини антитела, най-вероятно при целуване на децата. Най-масовото заразяване констатирахме до 20 г. С напредване на възрастта първичната инфекция е по-рядко срещано явление и предимно при амбулаторно изследвани пациенти (Табл.4). Следователно откриваеми anti-VCA IgM след тази възраст могат да предполагат и реактивация на вирусната инфекция.

**Таблица 4. Относителен дял на anti-VCA IgM серопозитивността в Североизточна България в зависимост от възрастта**

Възрастова група	N*	Anti-VCA IgM серопозитивност	
		N **	Относителен дял %, (95%CI)
Под 1 г.	360	43	11.9%(8.8%-15.8%)
1-5 г.	921	286	31.1%(28.1%-34.2%)
6-10 г.	503	139	27.6%(23.8%-31.8%)
11-15 г.	389	118	30.3%(25.8%-35.2%)
16-20 г.	419	150	35.8%(31.2%-40.6%)
21-25 г.	298	47	15.8%(11.8%-20.4%)
26-30 г.	308	33	10.7%(10.7%-14.7%)
31-35 г.	366	40	10.9%(7.9%-14.6%)
36-40 г.	357	33	9.2%(6.4%-12.7%)
41-45 г.	278	16	5.8%(3.3%-9.2%)
46-50 г.	280	17	6.1%(3.6%-9.5%)
51-55 г.	277	9	3.2%(1.5%-6.1%)
56-60 г.	314	15	4.8%(2.7%-7.8%)
61-65 г.	286	13	4.5%(2.4%-7.6%)
66-70 г.	282	16	5.7%(3.3%-9.1%)
Над 71 г.	323	15	4.6%(2.6%-7.5%)
<b>Общо</b>	<b>5961</b>	<b>990</b>	<b>16.6%(15.7%-17.6%)</b>

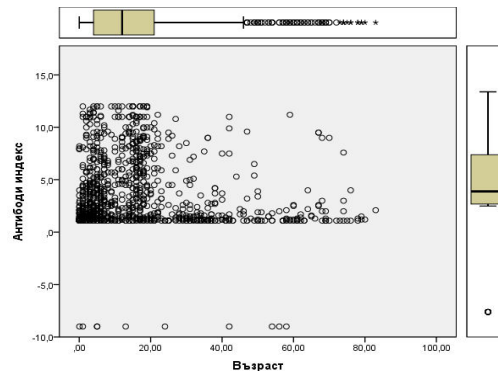
N\*-общ брой изследваните във възрастовата група

N\*\* - положителни на anti-VCA IgM във възрастовата група

Установихме връзка между показателя възраст и положителността в anti-VCA IgM чрез Chi-Square тест ( $p < 0.05$ ), като силата е средна, установено чрез тест на Cramer's  $V = 0.313$ .

Съпоставихме положителните резултати в anti-VCA IgM според получения AI и възрастта на пациентите (Фиг.5). Отново се потвърждава факта, че първичната инфекция по-често е в по-ранните възрасти, с преобладаване на случаите с по-висок AI.

**Фигура 5. Разпределение на лицата в зависимост от anti-VCA IgM AI и възрастта**

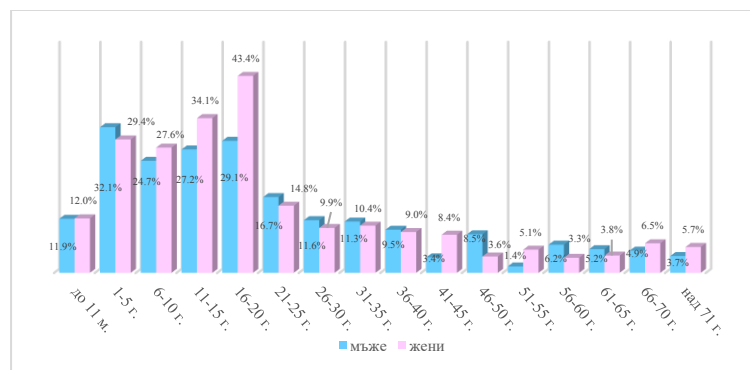


Основен въпрос в интерпретиране на резултатите от изследването на anti-VCA IgM е разграничаването на случаите с първична инфекция от тези с реактивация. Допускаме, че положителните резултати при пациентите в по-големите възрасти (след 41 г.), вероятно показват реактивация на EBV, но при някои от тях не може да се изключи първична инфекция. Според нас, при по-възрастните пациенти трябва да се използват и другите маркери и методи, за да може да се направи коректна интерпретация на резултата.

От общо изследваните лица, относителния дял на положителните anti-VCA IgM е 16.4% (95%CI:15.2%-17.7%) при мъжете (n=538) и 16.9% (95%CI: 15.5%-18.3%) при жените (n=452) . Средната възраст на сероположителните мъже е 15.61 (SD±17.11) и е по-ниска от тази на положителните жени - 17.98 (SD±17.33). Чрез Chi-Square тест се установи, че разликата по пол не е статистически значима ( $p>0.05$ ) и Cramer'sV= 0.006.

При сравнителен анализ на резултатите в зависимост от пола и възрастта установихме, че лицата от мъжки пол се инфекцират по-често в ранна детска възраст (1 г. - 5 г.). В училищния период заразяването на лицата от женски пол е с най-голяма честота. Най-съществена разлика в заразяването между двата пола установихме в групата на 16 г.- 20 г. (Фиг. 6).

**Фигура 6. Относителен дял на anti-VCA IgM положителните лица в зависимост от възрастта и пола**



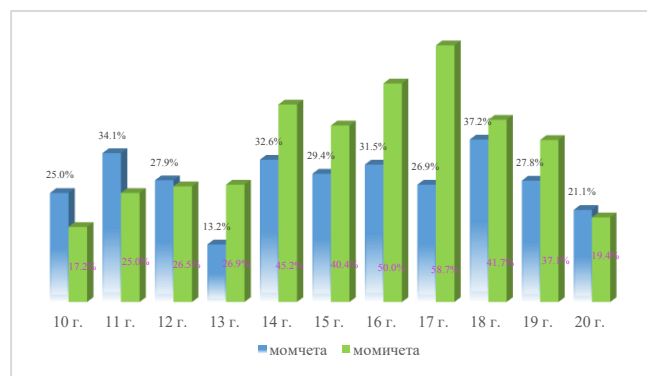
### Характеристика на лицата във възрастов диапазон 10-20 г.

Предвид дефинираните от нас възрастови групи с най-масово доказване на anti-VCA IgM характеризирахме данните, свързани с възрастов период 10 г. - 20 г., тъй като той включва според световната литература юношеския период на най-масовата клинична манифестация на EBV-инфекцията, а именно ИМ. Изследваните лица в този възрастов период, представляват 14.8% (95% CI:13.9% - 15.7%, n=885) от всички изследвани.

Разпределени по пол, момчетата представляват 54.4% (95% CI:51.0% - 57.7%, n=481), а момичетата - 45.6% (95% CI:42.3% - 49.0%, n=404), като във всички възрасти (с изключение на 15 годишните), момчетата преобладават над момичетата. Същата тенденция отчитаме и при разпределението по година на изследване. Най-много изследвани момчета има през 2016 г., а момичета - през 2012 г.

Според нашите данни средната серопозитивност в anti-VCA IgM, свързана вероятно с клинична картина на ИМ в този възрастов период е 28.7% (95% CI:25.9% - 31.6%, n=284). Следователно почти 1/3 от случаите на първична инфекция настъпват в юношеството. Относителният дял на положителните лица от мъжки пол - 27.9% (95% CI:23.9% - 32.1%, n=134) е по-нисък от относителния дял на положителните лица от женски пол - 37.1% (95% CI:32.4% - 42.0%, n=150) ( $p < 0.05$ ). Момичетата с положителни резултати значително превалят във възрастите между 13 г. и 19 г., докато момчетата с положителни резултати превалят в по-ранна възраст (Фиг.7). Тези данни потвърждават констатираното от нас, че момчетата се заразяват по-масово в по-ранна възраст.

**Фигура 7. Относителен дял на положителните за anti-VCA IgM по пол и възраст**



Според литературата инфектирането с EBV започва в детска или юношеска възраст. Идентифицирани рискови фактори, касаещи времето на заразяване са социално-икономическите. Съществуват много доказателства за социалния статус, като определящ фактор за началото на първичната инфекция. Приема се, че ниският социален статус обуславя заразяване в по-ранна възраст. Широкото разпространение на EBV в човешката популация е свързано най-вече с лесното му предаване при близък интимен контакт и това не може да се ограничи с противоепидемични мерки. Все още е дискутабилен въпросът кога е най-добре да настъпи заразяване - в ранна възраст или в юношеството. Заразяването в ранна възраст е безсимптомно в повечето от случаите, но редица автори документират по-висока виремия и по-високи титри на антителата, като допускат по-

висок риск от някои малигнени (БЛ, НФК) или автоимунни заболявания (мултипла склероза). От друга страна заразяване в юношеска възраст протича в повече от половината случаи с ИМ, а това според някои проучвания увеличава риска от последващо развитие на БХ.

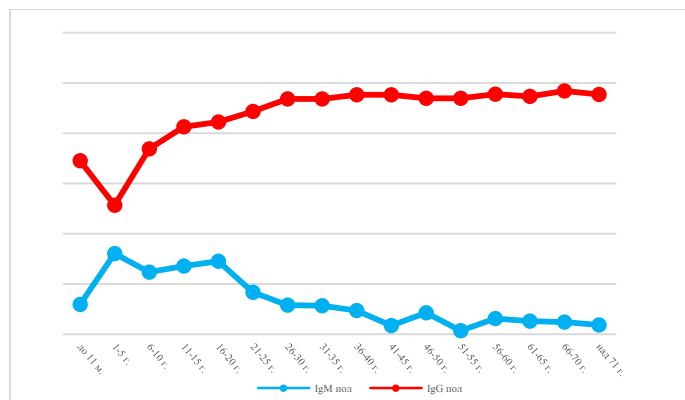
Анализът на нашите данни в Североизточна България показва, че първичната среща с EBV е в ранното детство, предучилищния и училищен периоди, а основният механизъм е хоризонталния. Около 1/3 от децата се заразяват до 5 годишна възраст, вероятно с неспецифични клинични признаци. Само добрата осведоменост на клиничните лекари в нашия регион насочва пациентите за насочено специфично изследване. Наблюдава се бимодален модел и по-висок относителен дял във възрастови групи 1 г. - 5 г. (31.1%) и 16 г. – 20 г. (35.8%). Тези данни трудно могат да се интерпретират в синхрон със световните проучвания, които разделят времето за първичното заразяване в две групи в зависимост от социо-икономическия модел на развитие на страните. В развиващите се страни заразяването става в детска възраст, докато в развитите страни - в периода на юношеството. Предвид на по-високия относителен дял на новозаразени във възрастова група 16 г. - 20 г. приемаме, че по-скоро следваме модела на развитите страни. Заразяването в ранното детство свързваме с основния път на предаването на вируса чрез орофарингеалните секрети, което се случва в семейната среда или в организираните детски колективи. С това проучване не може да се направи оценка на влиянието на доходите на домакинствата, нивото на образование и други фактори, които биха имали значение за определяне на риска от инфектиране в тази възраст. Смятаме, че то се дължи на широкото разпространение на EBV и установено излъчване на вируса с орофарингеалните секрети и от асимптомните носители. Периодично излъчване на вирус със слюнката е част от жизнения му цикъл, установено в 15% - 20% при здрави серопозитивни младежи и в по-висок процент при имunosупресирани лица. Безсимптомната реактивация при възрастни играе съществена роля за трансмисия към серонегативни членове на семейството и най-вече деца. Вторият по-изразен пик в периода на юношеството се дължи на прибавяне на сексуалните контакти, като рискът се определя и от броя на сексуалните партньори. Сексуалният път на предаване на EBV е възможен, тъй като вирусът е доказан в половите секрети. В проучвания от Crawford D. et al. (2002) и Higgins C. et al. (2007) е установена по-висока честота на инфектиране при неупотребяващи презервативи млади хора, но са необходими допълнителни проучвания в тази връзка, тъй като не може да се пренебрегне и заразяването чрез целувка. Високата честота на заразяване по време на юношеството предполага по-висока честота на ИМ като клинична изява.

При анализиране на данните на положителните за този маркер лица по възрастови групи и години установихме, че в почти всички възрастови групи има намаляване на положителните лица през 2016 г. спрямо 2010 г. Предвид това, че в по-големите възрастови групи има по-малко изследвани лица и сред тях има случаи на вероятна реактивация на вируса, ние анализирахме данните при лицата до 26 годишна възраст. Най-изразено намаляване на новозаразените лица има във възрастова група 6 г. – 10 г. - от 38.1% през 2010 г. до 18.9% през 2016 г. Същите резултати получихме и във възрастова група 11 г. – 15 г. - от 41.2% през 2010 г. до 24.0% през 2016 г. Единствено във възрастова група 16 г. – 20 г. установихме увеличаване относителния дял на

новозаразените лица от 35.6% през 2010 г. до 36.9% през 2016 г. В периода 2013 г. - 2015 г., в анализираниите възрастови групи, относителните дялове на позитивиралите се лица се движат вълнообразно. Това вероятно означава изместване на първичното заразяване в по-големите възрастови групи, но може да се потвърди само след последващо наблюдение. Възможно е върху резултатите да влияят и други фактори, като времето на вземане на пробата за изследване, наличие на изолирани IgG модели на имунен отговор и липса на IgM имунен отговор, както и количества на антителата под прага на чувствителност на теста и др.

При сравнителен анализ на положителните anti-VCA IgG и IgM лица се наблюдава обратно пропорционална зависимост, независима от пола. С напредване на възрастта се увеличава серопозитивността, дължаща се на anti-VCA IgG, докато случаите на първично заразяване установено чрез определяне на anti-VCA IgM намаляват (Фиг.8).

**Фигура 8. Разпределение на положителните лица в anti -VCA IgG и IgM**



В заключение, заразяването в нашата популация става в ранното детство и в периода 16 г.-20 г., с по-висок пик при по-големите, съответстващо на модела на развитите страни. Момчетата се заразяват в по-ранна възраст от момичетата.

#### 4.1.3 Ретроспективен анализ на резултатите от изследването на anti-VCA IgM/ IgG при жените в репродуктивна възраст (15 г.- 49 г.) и децата до 1 г.

Направихме преглед на средната серопозитивност при жените в репродуктивна възраст (15 г. - 49 г.) по критериите на Световната здравна организация. От 1126 жени в тази възраст в ELISA anti-VCA IgG позитивираха 76.8 % (95% CI:74.2% - 79.3%, n=862), като изключихме тези с наличие и на anti-VCA IgM. Най-ниска серопозитивност доказахме при лицата под 22 г. След тази възраст относителният дял на позитивните се повишава, като в повечето от възрастите е над 77.0%. В проучване от Ivanova L. (2000), определените чрез IFA серопозитивни жени в Североизточна България са 82.5%, а по данни от Великобритания на Pembrey L. et al. (2013) резултатите са по-високи (93.6%) при бременни жени от три етнически групи. Увеличаване на серопозитивността с възрастта и наблюдаваната тенденция за увеличаване на възрастта за ражданията сред българското население са фактори, които ограничават първична инфекция по време на бременност. В същото време има етнически групи, в които ражданията са по-чести

именно в юношеския период в който доказахме по-ниска серопозитивност и по-висок процент на IgM позитивни случаи.

В 17.1% (95% CI:14.9% - 19.4%, n=190) установихме наличие на anti-VCA IgM, суспектни за първична инфекция или реактивация. Най-висок е относителният дял във възрастите до 19 г. От всички изследвани жени, 6.1% нямат серологични данни за инфекцираност с EBV, следователно възможността за първична инфекция при жени в репродуктивна възраст трябва да се има предвид при бременност. При изследване на голяма извадка от бременни жени в Норвегия Eskild A et al. (2005) са установили данни за първична инфекция в 1.5% от случаите и в 25% - за реактивация. В по-ново проучване от Naeri S. et al. (2010) се установяват данни за реактивация на инфекцията в 35 % от изследваните бременни жени. Счита се, че реактивацията на EBV в този период води до по-кратка продължителност на бременността и раждане на бебета с по-ниско тегло. Други данни от Lehtinen M. et al., (2003) показват, че реактивирането на майчината EBV инфекция се свързва със значително висок риск от развитие на остра лимфобластна левкемия в потомството. Следователно, патологичните и клинични последици от първичната инфекция и реактивацията на EBV по време на бременност се нуждаят от допълнително проучване.

При децата до 1 г. (n=360), относителният дял на тези до 6 месечна възраст е 75.3% (95% CI:70.5% - 79.6%, n=271). В този период изследванията се правят най-често за установяване на вътреутробна и/или ранна постнатална инфекция.

При децата до 6 месечна възраст относителният дял на серопозитивните е 68.0%, и намалява до 36.0% при тези между 7- и 11-месечна възраст. Изключени са децата, които имат серологични данни за първична инфекция.

Най-висок относителен дял на anti-VCA IgG серопозитивни установихме при децата до 1 месец – 83.5% (95% CI:75.6% - 89.6%), след което следва значително понижаване с достигане до 25.0% (95% CI:7.3%-52.4%) при децата на 6 месечна възраст. Причина за това е постепенното изчерпване на пасивните майчини антитела в зависимост от изходните нива на преминалите през плацентата, и праговата чувствителност на теста. С изчерпване на майчините антитела децата започват да стават податливи на инфекция, което се регистрира със сероконверсия. Динамиката в данните ни съответстват с предходното проучване на Ivanova L. (2000), в което чрез IFA тест също е определена висока серопозитивност (80%) при новородените, която бързо спада и на 6 месечна възраст достига 15%. Относителният дял на положителните anti-VCA IgG жени в репродуктивна възраст корелира с този на децата до 6 м. (Pearson's= 8.395,p=0.004), което означава, че бебетата получават майчини антитела осигуряващи защитата им в този период.

От изследваните в anti-VCA IgM деца, 11.9% (95% CI:8.8% - 15.8%) показват положителен резултат и според лабораторните данни вероятно се касае за първична инфекция. Преобладават изследваните до 1 м., при които доказахме наличие на специфични IgM антитела в 8.3% (95% CI:4.6% - 15.6%). Най-висок относителен дял положителни anti-EBV-VCA IgM бебета има при тези на 8 месечна възраст - 23.5% (95% CI:6.8% - 49.9%) (Табл.5), което потвърждава факта, че първичното заразяване започва още след изчерпване на пасивните майчини антитела. Позитивността в anti-VCA IgG на децата до 1 г. е сигнификантно по-висока от тази в anti-VCA IgM (p<0.05).



**Таблица 5. Брой и относителния дял на anti-VCA IgM и anti-VCA IgG положителните бебета под 1 годишна възраст**

Възраст в месеци	N*	Anti-VCA IgM/IgG серопозитивност			
		N**	N***	Относителен дял на IgG позитивните (95%CI)	Относителен дял на IgM позитивните (95%CI)
1-6 м.	269/271*	183	31	68.0%(62.1%-73.6%)	11.4%(7.9%-15.8%)
7-11 м.	89	32	12	36.0%(26.1%-46.8%)	13.5%(7.2%-22.4%)
<b>Общо</b>	<b>358/360*</b>	<b>215</b>	<b>43</b>	<b>60.1%(54.8%-65.2%)</b>	<b>11.9%(8.8%-15.8%)</b>

*N\** -общ брой изследвани деца за съответния маркер. Със\* са означени изследванията за IgM.

*N\*\** - брой на серопозитивните за IgG от съответната възраст

*N\*\*\** - брой на серопозитивните за IgM от съответната възраст

**Заклучение:** Установената висока серопозитивност сред жените в детеродна възраст показва, че рискът от инфектиране по време на бременност и вътреутробно заразяване на плода е малък. Изчерпване на майчините антитела в първите месеци и периодичното излъчване на вируса със слюнката поставят в риск новородените от ранно инфектиране. Твърде разпространената практика за целуване на бебетата по устата и други широко разпространени практики допускат трансмисия на вируса чрез орофарингалните секрети, което налага повишаване на здравната култура на младите майки за превенция на ранното заразяване. Наличието на серонегативни жени в по-късна детеродна възраст (около 6.0%) и на жени със серологични данни за първична инфекция (17%) представлява риск по време на бременността, което да се отрази върху развитието на плода. Въпреки малкото данни за участието на вируса в неонаталната патология, заразяване с него трябва да се допуска и да се търси, след изключване на най-честите инфекциозни причинители.

## 4.2 Ретроспективен анализ на заболяванията асоциирани с EBV в Североизточна България за периода 2010-2016 г.

### 4.2.1 Анализ на пациентите с диагноза ИМ

Анализирахме 746 пациенти с клинични критерии и диагноза ИМ. Вероятно броят на случаите е по-голям, тъй като при амбулаторните пациенти по-често липсва насочваща диагноза от личните лекари и не винаги се диагностицира в доболничната помощ. ИМ не подлежи на регистрация и контрол по Наредба № 21 от 18 юли 2005 г. за реда за регистрация, съобщаване и отчет на заразните болести. Това е една от причините да няма пълна информация. Заболяемостта от ИМ варира в различните региони в света. В САЩ ежегодно се регистрират 500 случая на 100 000 население, с по-висока заболяемост във възрастта 15 г. - 24 г. (Hellwig T. et al., 2013). По –ниска средна годишна честота - 130 случая на 100 000 население е установена в Израел от Grotto I et al (2003).

От изследваните пациенти, 57.6% (95%CI:54.0%-61.2%, n=430) са момчета и 42.4% (95%CI:38.8%-46.0%, n=316) момичета. Следователно, по-често тази диагноза се поставя при лицата от мъжки пол. Средната възраст на изследваните е 9.56 г. (SD±8.26). Средната възраст на момчетата е 8.87 (SD±8,19) и е по-ниска от средната възраст на момичетата 10.49 (SD±8,27). Най-често диагноза ИМ се поставя във възрастова група 1

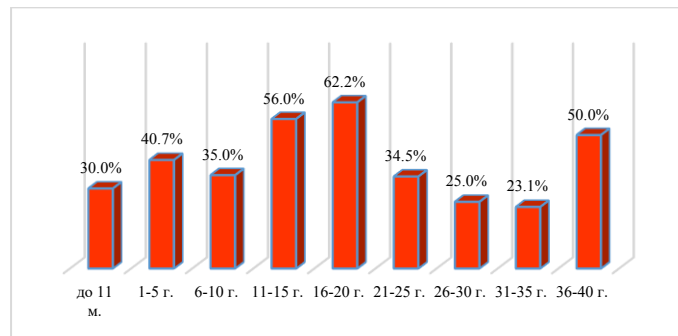
г. - 5 г. (35.0%), следвана от възрастова група 6 г. - 10 г. (31.1%). Това обяснява защо децата във възрастова група 1 г. - 5 г. са изследвани най-често, както установихме в анализа за серопревалентност и в този за определяне началото на първичната инфекция. В тази група констатирахме първично заразяване основно при момчетата и това може да обясни тяхното преобладаване. Интересен е факта, че диагноза ИМ е поставяна предимно при деца в ранна възраст или в начална училищна възраст, докато рискът от развитие на класическа клинична картина е най-висок в юношеския период и според литературата. Според нашите данни от предходния анализ, най-висок относителен дял на anti-EBV-VCA IgM установихме във възрастовата група 16 г. - 20 г. Следователно би трябвало да очакваме по-често поставена клинична диагноза ИМ в тази група. Момчетата преобладават във възрастова група 1 г. - 5 г. (35.8%), докато момичетата преобладават във възрастовите групи от 6 г. до 20 г.

Серологични данни за остра инфекция установихме в 43.2% (95%CI:39.6%-46.8%, n=322). При разпределение на позитивните лица по пол установихме, че 41.9% (95% CI:37.2% - 46.7%, n=180) са от мъжки пол и 44.9% (95%CI:39.4%-50.6%, n=142) – от женски пол, ( $p < 0.05$ ). Следователно при момчетата по-често се поставя диагноза ИМ, но при момичетата потвърдението с лабораторни маркери е по-често. По-нисък относителен дял е установен в проучване в Плевенски регион на 37 хоспитализирани пациенти в периода 2008 г. - 2012 г. Серологични данни за остра EBV инфекция са доказани в 38% (Ганчева Г. и сътр 2013). При изследване на 330 пациенти с ИМ на възраст 18 г. - 23 г., Grotto I. et al. (2003) установяват положителен резултат в 55.9% от изследваните. При анализ на литературата по отношение диагностиката на остра EBV инфекция и нашият опит, като възможни причини за по-ниския относителен дял на IgM позитивен имунен отговор в нашето проучване са неточно или ориентировъчно поставена диагноза, ранно вземане на кръвната проба, и наличие на профил с изолирани anti-VCA IgG, което се наблюдава в около 7% от случаите по литературни данни (De Paschale M., 2010). Установена е висока степен на вариабилност в серологичния отговор към EBV, най-вече при позитивиране на IgM антителата срещу VCA. Това изисква внимателно интерпретиране в случаите с данни за първична инфекция и положителен единствено anti-VCA IgG имунен отговор, Трябва да се използват допълнителни серологични възможности, като например тест за определяне на авидността на IgG антителата.

Най-висок относителен дял на лабораторно потвърдените случаи с ИМ регистрирахме във възрастова група 16 г. - 20 г. - 62.2% (95% CI:52.5% - 71.2%, n=69), следвана от възрастова група 11 г. - 15 г. - (56.0% (95% CI:44.1% - 67.5%, n=42) (Фиг.9). Независимо, че според нашия анализ клиничната диагноза ИМ е поставяна по-често в ранната детска и ранна училищна възраст, лабораторно потвърдените случаи с помощта на специфични вирусни маркери са в периода на юношеството. Увеличаване относителния дял на случаите на ИМ по време на юношеството се обяснява със започване на сексуалните контакти и с така наречената „deep kissing“ (дълбока целувка), при което се придобива по-голямо количество вирус. Това води до бързо колонизиране на В лимфоцитите и съответно индуциране на по-мощен Т клетъчен имунен отговор (Crawford DH., 2006; Balfour NH. et al., 2013). Авторите считат, че развитието на клинична картина на ИМ до голяма степен се определя от високия вирусен товар и

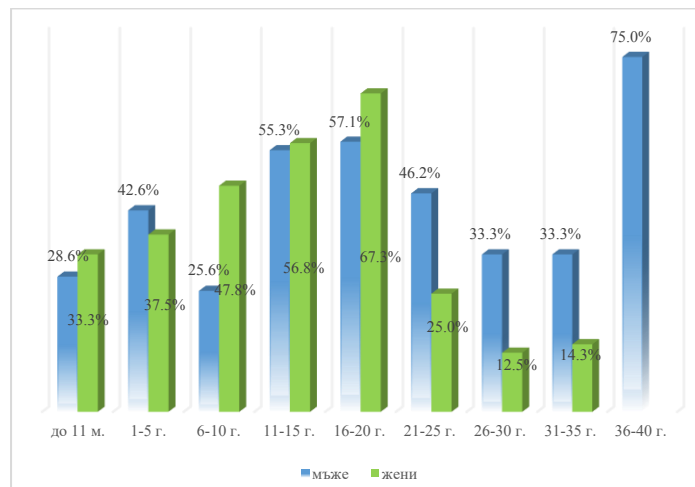
високия брой NK и CD8 + T клетки. В няколко проучвания е установена корелация между вирусния товар и развитието на симптоми (Balfour NH. et al. 2005; Balfour NH. et al. 2013). Във възрастова група 46 г. - 50 г. регистрирахме един лабораторно потвърден случай на ИМ, но предвид на малобройната извадка няма да го коментираме. Средната възраст на anti-VCA IgM положителните пациенти с диагноза ИМ е 9.99 (SD±7.78). Положителните лица от мъжки пол са в по-ниска средна възраст 9.7 г. (SD±8.57) спрямо лицата от женски пол -10.35 г. (SD±6.67) (Фиг.9).

**Фигура 9. Относителен дял на положителните anti-VCA IgM пациенти с диагноза ИМ**



При сравнителния анализ на относителните дялове на anti-VCA IgM положителните пациенти по възрасти, констатирахме статистически значими разлики ( $p < 0.05$ ) между тези, в които най-често настъпва първичното заразяване и останалите възрастови групи. В периода на юношеството лабораторно потвърдените случаи на ИМ при жените са повече от тези при мъжете. Представените данни корелират с данните от сероепидемиологичния анализ, в който установихме, че най-често първичната инфекция настъпва в възрастова група 16 г. - 20 г. - 35.8% (95% CI:31.2% - 40.6%, n=150), с преобладаване на момичета - 43.4% (95% CI:36.3% - 50.6%, n=85) спрямо момчетата - 29.1% (95% CI:23.3% - 35.6%, n=65). Момчетата с лабораторно потвърдена диагноза ИМ, преобладават във възрастова група 1 г. - 5 г., което също корелира с данните от анализа за начало на първичната инфекция, както и във възрастта след 21 г. Макар и рядко, първична инфекция може да настъпи и в по-късна възраст и също да се прояви с клинични данни за ИМ (Фиг.10).

**Фигура 10. Относителен дял на лицата с клинична диагноза ИМ положителни за anti-VCA IgM в зависимост от пол и възраст**



При анализ на отрицателните anti-VCA IgM лица с клинична диагноза ИМ, 33.9% (95% CI:54.8% - 64.4%, n=253) са положителни в anti-VCA IgG. Тези данни формират една от групите, при които се налага използване на допълнителни методи или маркери за установяване на изолирани IgG модели.

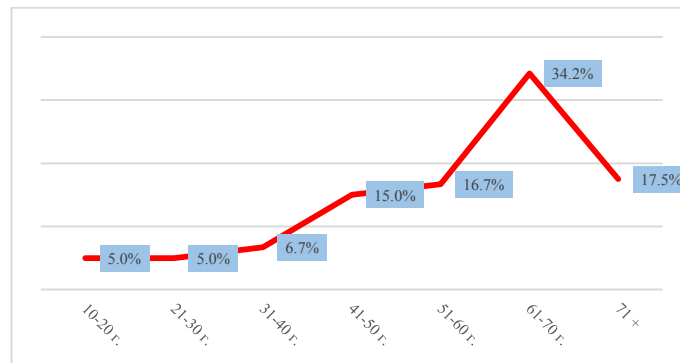
Нашите данни показват, че най-често диагнозата ИМ се поставя през по-студените месеци от годината, когато циркулират множество други респираторни и грипни вирусни инфекции. През месеците декември – в 16.8% и ноември – в 15.4% от пациентите са с поставена клинична диагноза ИМ. Най-малко клинично диагностицирани случаи регистрирахме през месеците август (8.5%) и септември (7.7%). Лабораторно потвърдените случаи на EBV асоциирана ИМ наблюдавахме по-често през месеците октомври и юни, без ясно обособена сезонност.

**В заключение** въпреки, че ИМ е самоограничаващо се заболяване, то се асоциира с повишен риск от развитие на БХ и с някои субтипове НХЛ. Това изисква точна и адекватна диагностика. Серологичните методи са достатъчно достоверен критерий за диагностициране на първична EBV инфекция. В направеното от нас проучване 33.9% от лицата с диагноза ИМ имат само anti-VCA IgG и трябва да бъдат изследвани допълнително за потвърждаване или отхвърляне на остра инфекция, което следва да се утвърди в бъдещата лабораторна практика.

#### 4.2.2 Анализ на пациентите с диагноза НХЛ

Анализирахме 120 лица с диагноза НХЛ за наличие на EBV инфекция. Преобладават представителите на мъжкия пол 53.3% (95% CI:44.0% - 62.5%, n=64) спрямо тези от женски пол 46.7% (95% CI:37.5% - 56.0%, n=56). Честотата на случаите нараства с възрастта и най-много регистрирани пациенти има след 61 г. (Фиг.11).

**Фигура 11. Относителен дял на лицата с диагноза НХЛ по възрастови групи**



В ELISA anti-VCA IgM, положителен резултат установихме в 7.5% (95% CI:3.5% - 13.8% n=9), от които 12.5% (95% CI:5.2% - 24.1%, n=7) жени и 3.1% (95% CI:0.4% - 10.8%, n=2) мъже. Най-много положителни резултати има във възрастови диапазони 10 г. - 20 г. и 21 г.-30 г. - 33.3% (95% CI:4.3% - 77.7%, n=2). В зависимост единствено от тези резултати, не можем със сигурност да твърдим, че позитивността в ELISA anti-VCA IgM дефинира първична инфекция, реактивация или фалшива неспецифична позитивност. Положителни anti-VCA IgM резултати доказахме както при лица до 25 г., така и при лица над 40 г. От общо положителните 9 пациенти, 5 показват антитяло индекс (AI) между 1.1 и 2.2. Един от пациентите (19 г.) е със значително висок AI=10. На базата на анализа за серопревалентността в по-малките възрастови групи този положителен имуен отговор може да дефинира първична инфекция, което е в съответствие с началото на инфектиране на населението в нашата страна. В групата след 40 годишна възраст, по-вероятно става въпрос за реактивация. Смятаме, че и в двата случая резултатите трябва да бъдат потвърдени с други методи.

При изследването за наличие на anti-VCA IgG, положителен резултат показват 95.8% (95% CI:91.6% - 99.1%, n=115) и 3.2% (95% CI:0.9% - 8.4%, n=4) - отрицателен резултат. От отрицателните пациенти трима са на възраст над 60 г. и един - от възрастова група 21 г. - 30 г. Резултатите от изследването в anti-VCA IgG показват, че 33.3% от пациентите имат титър на антителата под 100 RU/ml (релативни единици) и 29.2% - над 201 RU/ml. Според критериите на използваните от нас тестове, всички стойности над 22 RU/ml се считат позитивни. Тъй като изследванията са извършени в единични серумни проби, не можем да дефинираме динамика в антитяло отговора. В същото време отчитаме, че не всички пациенти с НХЛ имат високи anti-VCA IgG в единична серумна проба.

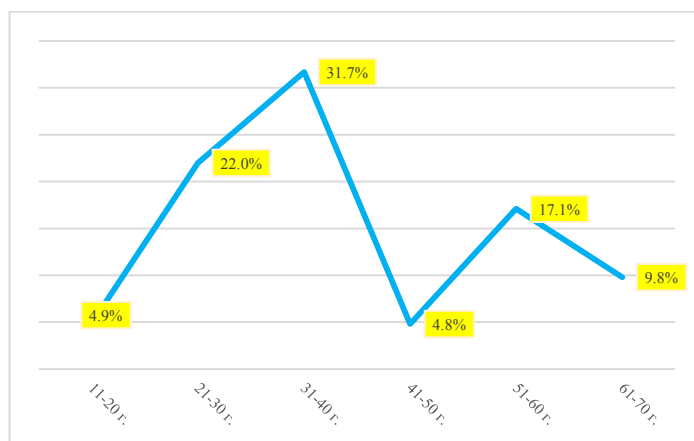
**В заключение,** EBV не се асоциира с всички случаи на НХЛ, който факт е установен в много проучвания. Натрупването на доказателства за етиологичната му и/или патогенетична роля в конкретни региони на света има важно епидемиологично значение и може да послужи като стимул за разработване на профилактични мерки. Използването на серологичните методи, като по-евтини и по-лесно приложими в прогнозиране на връзката между EBV и НХЛ трябва да бъде допълнително проучено. Тълкуването на резултатите на базата на използваните серологични методи и определянето на профила антитела, които имат значение при НХЛ в различните етапи на

заболяването, остават отворени въпроси и могат да бъдат обект на последващи научни изследвания. По литературни данни изследването за наличие на антителата срещу ЕА, в по-голяма степен отразява наличие на вирусна репликация и може да бъде използвано при случаите с данни за реактивиране на инфекцията

#### 4.2.3 Анализ на пациентите с диагноза БХ

В ретроспективно анализирания период изследваните пациенти с БХ са 41. Преобладават изследваните мъже - 58.5% (95% CI:42.1% - 73.7%, n=24) в сравнение с изследваните жени - 41.5% (95% CI:26.3% - 57.9%, n=17). Най-много изследвани пациенти има във възрастова група 31 г. - 40 г. - 31.7% (95% CI:18.1% - 48.1%, n=13), следвана от 21 г. - 30 г. - 22.0% (95% CI:10.6% - 37.6%, n=9) (Фиг.12).

**Фигура 12. Разпределение на лицата с диагноза БХ по възраст**



От изследваните в ELISA anti-VCA IgM, положителен резултат установихме при 4 от пациентите - 9.8% (95% CI:2.7% - 23.1%). Преобладават положителните жени - 11.8% (95% CI:0.4% - 12.3%, n=2), положителните мъже са - 8.3% (95% CI:1.0% - 27.0%, n=2). Разпределението на пациентите с положителен резултат в зависимост от възрастта, показва 25.0% деца под 10 г. и 23.1% - във възрастова група 31 г. - 40 г. Всички изследвани пациенти са положителни в ELISA anti-VCA IgG.

При прегледа на резултатите от изследването в anti-VCA IgM трима от положителните пациенти имат AI между 1.1 и 1.3 и един – 6.99 AI (жена на 31 г.). От изследването за определяне на anti-VCA IgG установихме титър под 100 RU/ml в 31.7% от пациентите, между 101 RU/ml и 200 RU/ml – в 41.5% и над 201 RU/ml – 26.8%.

Данните от НСИ за България в интервал 2010 - 2015 г. показват, че случаите на БХ са по-малко от тези с НХЛ. Най-много новорегистрирани случаи има през 2010 г. (137) и най-малко - през 2015 г. (106). По литературни данни честотата е около 1% от всички неоплазии, като за Европа заболеваемостта е 2.2/100 000, а за България – 2.4/100 000 (Генова М. и съавт. 2015).

**В заключение** можем да кажем, че прякото участие на EBV в етиологията и патогенезата на БХ според литературата може да се докаже по-точно в имунохистохимични методи за откриване на вирусни антигени и *in situ* хибридикация. Има проучвания и за ролята на PCR техниката при EBV свързаните лимфоми. Според

нас, серологичните методи са първият избор, който насочва към по-нататъшни изследвания.

#### **4.3 Проспективно изследване на потенциално рискови пациенти и пациенти с предполагаема първична инфекция. Приложение на различни серологични методи.**

На базата на ретроспективно направеното проучване и анализиране на първоначалните серологични данни установихме серологични профили, които трудно могат да бъдат еднозначно интерпретирани и поради това представляват сериозно диагностично предизвикателство. В допълнителен анализ на подбрани по определени критерии проби на пациенти, изследвахме авидността на VCA-IgG, търсихме anti-EA (D) и anti-EBNA1 IgG. При част от пробите приложихме IgM WB анализ. Основните критерии за подбор, които следвахме, бяха първоначалните серологични данни за антитела срещу VCA, диагноза и възраст. Тези критерии следвахме и при групиране на пробите по анализи и при интерпретиране на резултатите. Признакът пол не беше критерий за изключване. Част от пробите включихме в повече от един тест.

##### **4.3.1 Приложение на ELISA anti-VCA IgG авидност.**

Тестовите за определяне на авидност на IgG не са рутинни в диагностичните лаборатории в България. За доказване на тяхната ефективност и възможности изследвахме различни групи пациенти.

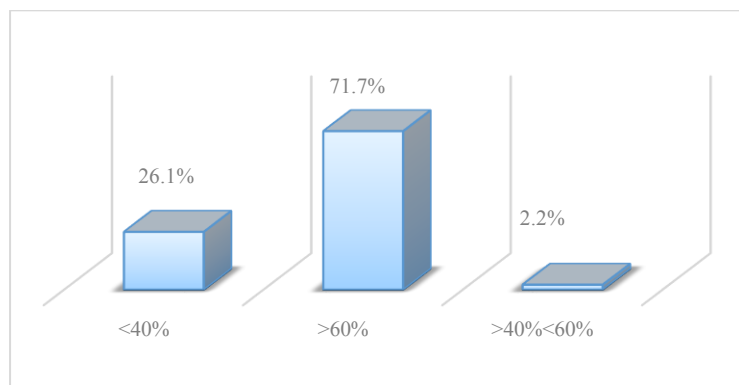
Изследвахме 46 серумни/плазмени проби от пациенти, разпределени в две групи. По-голямата част (първа група), съставлява 71.7% (95% CI:56.5% - 84.0%, n=33). Включва пациенти с клиничната симптоматика, съответстваща на ИМ, показващи ELISA anti-VCA IgM негативен резултат и anti-VCA IgG позитивен резултат (първа група). Втората група пациенти, съставляваща 28.3% (95% CI:16.0% - 43.5%, n=13) е оформена съобразно серологичен профил anti-VCA IgM положителни / anti-VCA IgG положителни, възраст на пациента и диагноза различна от ИМ. В тази група IgM позитивността може да се дължи на първична инфекция или реактивация/реинфекция. Пробите от пациентите са изработени в теста за авидност преди да бъдат изследвани за наличието на anti-EBNA 1 IgG.

Възрастовият диапазон на изследваните е широк - от 8 месеца до 69 г. и средната възраст е 16.26 г. (SD±14.52) с (Mo)=5 години и (Me) =13 години. Средната възраст на лицата от първа група е значително по-ниска - 9.85 г. (SD±6.97)) от тази във втора - 32.54 г. (SD±16.14)). Преобладават проби на представители на мъжкия пол - 60.9% (95% CI:45.4%- 74.9%, n=28) в сравнение с тези на женския пол - 39.1% (95% CI:25.1%- 64.6%, n=18).

От изследваните 46 пациенти, 12 (26.1%; 95% CI:14.3% - 41.1%) показват ниска IgG авидност и са суспектни за остра инфекция. Един пациент е в сивата зоната, което интерпретирахме като напреднала остра инфекция. Останалите пациенти (n=33) са с висока IgG авидност на антителата (Фиг.13). Корелационен анализ между нивото на

авидност и възрастта на пациентите чрез определяне на Spearman's rank correlation ( $p > 0.05$ ), не показва зависимост между двата параметъра.

**Фигура 13. Относителен дял на изследваните пациенти в двете целеви групи в зависимост на IgG авидността на антителата**



В групата на лицата с ИМ от 33 положителни единствено в ELISA anti-VCA IgG, 24.2% (95% CI: 11.1% - 42.3%, n=8) са с ниска авидност. Във втората група с ниска авидност са 30.8% (95% CI: 9.1% - 61.4%, n=4) от пациентите. При съпоставяне на резултатите в двете групи изследвани пациенти не установихме статистически значима разлика ( $p > 0.05$ ) (Табл.6).

**Таблица 6. Относителен дял на пациентите с ниска ELISA anti-VCA IgG авидност в двете целеви групи**

груп а	N	<40%	40%-60%	>60%	Относителен дял на пробите с ниска авидност (95%CI)	Chi-square	P value
I	33	8	1	24	24.2% (11.1%-42.3%)	0.21	0.65
II	13	4	0	9	30.8% (9.1%;61.4%)		

Нашите данни показват по-висок относителен дял на пациенти с ниска авидност и наличие само на anti-VCA IgG в сравнение с друго проучване при лица до 10 г. с първична инфекция – 4.5% (De Paschale M. et al., 2009). По-висок дял на ниска авидност (55.6%) е установен от Chan K et al (2001), при изследване на 27 лица отрицателни в ELISA anti-VCA IgM и anti-EBNA 1 IgG. В 73.3% от тези случаи те доказват и присъствие на EBV ДНК. В контекста на възрастта, нашите пациенти са в такава, в която най-често настъпва първична инфекция, както беше установено в сероепидемиологичното проучване. Най-малкият пациент с клинична диагноза ИМ и ниска IgG авидност е на 10 м., най-големият - на 19 г. От пробите на пациентите, показали ниска IgG авидност преобладават децата до 5 годишна възраст. Вероятно в тази възрастова група има по-големи вариации в anti-VCA IgM отговора. При пациентите с висока IgG авидност може да се допусне участие на други вируси в етиологията на заболяването, най-често HCMV, поради сходните механизми на трансмисия. Наличие на изолирани anti-VCA IgG серологични профили при първична инфекция очевидно не е толкова често. Но предвид вариабилността в образуването на



антитела от клас IgM срещу VCA, не трябва да се пренебрегва. От друга страна липсата на anti-EBNA 1 IgG при първична инфекция утвърждава използването на тестовете за IgG авидност като по-информативни и точни в тези случаи.

Във втора група изследвани пациенти средната възраст на IgG ниско авидните е 24.25 г. (SD± 4.5) и значително по-висока – 36.23 г. (SD±18.28) при високо авидните. Резултатите корелират с данните от сероепидемиологичното проучване, в което установихме, че с увеличаване на възрастта риска от първична инфекция намалява. От пациентите с ниска IgG авидност двама са с работна диагноза НХЛ и двама - с диагноза хепатит, отрицателни за обичайните вируси, причинители на хепатит. В теста за авидност потвърдихме първична инфекция с EBV, което в комплекс с другите проведени изследвания доведе до промяна в диагнозите. При пациентите с висока авидност на IgG антитела (69.2%) допускаме възможността за вирусна реактивация или реинфекция, което не е необичайно явление както при имунокомпрометирани, така и при имунокомпетентни лица. Друг изследователски екип открива висока авидност на IgG в 49.0 % от случаите при пациенти с откриваеми антитела от клас IgM срещу VCA. Според авторите такъв серологичен профил има значение по-скоро за изключване на първичните инфекции отколкото на реактивация, тъй като последната има малко клинично значение при имунокомпетентните индивиди (Nystad T et al. 2007). Повечето от нашите пациенти с вероятна реактивация на инфекцията са на възраст над 35 г. Един от пациентите с висока IgG авидност е на 8 м. В този случай интерпретацията на резултата е затруднена. Обикновено майчините антитела според различни проучвания се изчерпват между 2 м и 8 м. след раждането (Chan C et al 2003). В случая резултатът може да се дължи на по-ранно заразяване с EBV и по-продължителна персистенция на IgM антителата. Също така е възможно IgG антителата да са все още от майчин произход и IgM резултатът да е фалшиво позитивен. В България не изключваме ранно заразяване с EBV, преди 1 годишна възраст. В тази възраст установихме 11.9% IgM положителни серумни проби за периода 2010-2016 г., които обаче не са потвърждавани с други методи. При конкретния пациент чрез Western blot за IgM не открихме антитела срещу VCA-p19 и VCA-gp125.

Установяване на вирусната реактивация е проблем в серологичната диагностика на EBV, тъй като липсват единни критерии за това. Определянето зрелостта на антителата може да подпомогне диагностиката, като отдиференцира първичните инфекции. С този метод не могат да се изключат възможностите за фалшиво положителни IgM антитела при високоавидни пациенти. В тази връзка предлагаме комбинацията с Western blot анализ.

#### **4.3.2 Приложение на тестовете за определяне на anti-EBNA1 IgG в ELISA.**

В научната литература изследването на anti-VCA IgM и IgG и anti-EBNA1 IgG се приема като рутинна серологична триада за определяне стадия на EBV инфекцията. Това се отнася най-вече за пациенти с продължително наличие на anti-VCA IgM и пациенти с реактивация/реинфекция (Hess R., 2004).

В теста за определяне на anti-EBNA1 IgG изработихме 82 серумни/плазмени проби, разпределени в три целеви групи, съобразно клиничната диагноза и резултатите

от определяне на изходния серологичен статус в ELISA anti-VCA IgM и anti-VCA IgG. От общо изследваните пациенти, 46 (33 от първа група и 13 от трета) са тествани и за авидност на anti-VCA IgG. Средната възраст на лицата е 26.49 г. (SD±20.26) и е в диапазон 8 м. - 69 г. Разпределението по пол е 61.0% (95% CI:49.6%-71.6%, n=50) мъже и 39.0% (95% CI:28.4%-50.4%, n=32) жени. Серологичният профил на участниците е показан на таблица 7.

**Таблица 7. Разпределение на пациентите в зависимост от серологичния профил**

Серологичен профил	N	Относителен дял, % (95%CI)
anti-VCA IgM(-)/ anti-VCA IgG (+)	57	69.5% (58.4%-79.2%)
anti-VCA IgM(+)/anti-VCA IgG (+)	25	30.5% (20.8%-41.6%)

Участниците в изследването са с различни клинични диагнози (Табл. 8) и резултати от първичните серологични изследвания. Интерпретацията на резултатите направихме съобразно тези критерии.

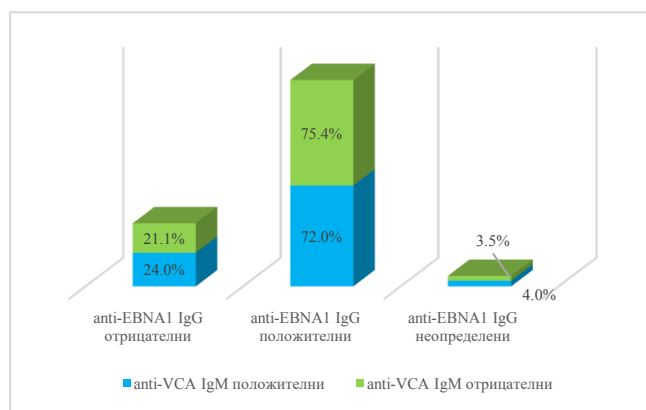
**Таблица 8. Брой и относителен дял на лицата в зависимост от клиничната диагноза и резултатите от първичните серологични изследвания**

Целева група	N	Относителен дял, (95%CI)
I. Първична инфекция (ИМ) / anti-VCA IgM(-)/anti-VCA IgG (+)	33	40.2%(29.6%-51.7%)
II. Пациенти с БХ- anti-VCA IgM(±) / anti-VCA IgG (+)	25	30.5% (20.8%-41.6%)
III. Други диагнози-anti-VCA IgM(+)/ anti-VCA IgG (+)	24	29.3% (19.7%-40.4%)
общо	82	100%

Общия дял на положителните anti-EBNA1 IgG пациенти е 74.4% (95% CI:63.6% - 83.4%, n=61). Според предходно проучване (Теохаров П, 2013) на 555 български здрави или болни лица е установено наличие на тези антитела в 69.4%, с висок процент позитивност в детска и юношеска възраст, демонстриращо ранно заразяване с вируса. Средната възраст на отрицателните лица в нашето проучване е значително по-ниска - 14.51 г. (SD±14.14) в сравнение с тази на положителните - 30.49 г. (SD±20.53). Резултатите съответстват на установеното начало на първична инфекция в нашата изследвана популация, с отсъствие на anti-EBNA1 IgG при първично заразяване. Очаквано установихме корелация между anti-EBNA 1 позитивността и възрастта (Spearman's rank correlation, p<0.05).

Anti-EBNA1 IgG не установихме при общо 22.0% от изследваните пациенти в трите групи, с преобладаване при по-младите. При кръстосаното анализиране на резултатите от изследването за наличие на антитела срещу VCA и EBNA 1 установихме наличие на anti-EBNA 1 IgG и при anti-VCA IgM положителните и при anti-VCA IgM отрицателните пациенти (Фиг.14). Следователно конкретните резултати трябва да се тълкуват и съобразно клиничната диагноза на пациента и очаквана остра инфекция и/или реактивация.

**Фигура 14. Относителен дял на лицата в зависимост от резултатите в anti-VCA IgM / anti-VCA IgG и anti-EBNA1 IgG**



\* всички изследвани лица са anti-VCA IgG положителни

Резултатите от изследването по целеви групи са представени в таблица 9.

**Таблица 9. Относителен дял на изследваните пациенти в anti-EBNA 1 IgG разпределени в целеви групи**

Резултат	N I	Относителен дял(95%CI)	N II	Относителен дял(95%CI)	N III	Относителен дял(95%CI)
Положителни за anti-EBNA1 IgG	23	69.7% (51.3%-84.4%)	21	84.0% (63.9%-95.5%)	17	70.8% (48.9%-87.4%)
Отрицателни за anti-EBNA1 IgG	9	27.3% (13.3%-45.5%)	3	12.0% (2.5%-31.2%)	6	25.0% (9.8%-46.7%)
Неопределени за anti-EBNA1 IgG	1	3.0% (0.1%-15.8%)	1	4.0% (0.1%-20.4%)	1	4.2% (0.1%-21.1%)
общо	33	100%	25	100%	24	100%

*NI- първична инфекция (ИМ) / anti-VCA IgM(-)/anti-VCA IgG (+)*

*II-пациенти с БХ-anti-VCA IgM(±) / anti-VCA IgG (+)*

*III-други диагнози-anti-VCA IgM(+)/ anti-VCA IgG (+)*

В първа група пациенти, която е с най-ниска средна възраст - 9.85 г. (SD±6.97)) установихме най-малък относителен дял от 69.7% (95% CI:51.3% - 84.4%, n=23) положителни за anti-EBNA1 IgG резултати. Средната възраст на положителните е по-висока - 11.57 г. (SD±6.83) от тази на общо изследваните. Преобладават момчетата 91.7% (11/12). Момчетата са 57.1% (12/21). Съответно в тази група е най-високият дял на лицата без anti-EBNA1 IgG (27.3%), които са суспектни за първична инфекция. Липсата на антитела срещу EBNA1 с наличие само на антитела от клас IgG срещу VCA може да доведе до неточна интерпретация при деца или имунокомпрометирани пациенти. В този случай тестовете за авидност са изключително полезни. В нашето проучване пациентите с профил anti-VCA IgM отрицателни/anti-VCA IgG положителни/anti-EBNA1 IgG отрицателни са с ниска IgG авидност(Табл.10).

**Таблица 10. Сравнително представяне на изследванията в теста за авидност на anti-VCA IgG и anti-EBNA1 IgG на лицата от първа група**

Anti-VCA IgG авидност	Anti-EBNA 1 IgG Положителен n=23	Anti-EBNA 1 IgG Отрицателен n=9	Anti-EBNA 1 IgG Неопределен n=1
Ниска, n=8	0	7	1
Висока, n=24	23	1	0
Неопределен, n=1	0	1	0

Несъответствие между двата теста установихме при един пациент с висока IgG авидност и, липса на anti-EBNA1 IgG. За разлика от нас, Chan K. et al (2001) установяват значително по-висок дял на лица с отсъстващи anti-EBNA1 IgG (44.4%) и висока IgG авидност, суспектни за първична инфекция. Следователно в тези случаи тестове за IgG авидност са необходими.

Във втора целева група средната възраст е най-висока – 41.16 г. (SD±13.99) и преобладаващия серологичен профил е anti-VCA IgM отрицателни / anti-VCA IgG положителни. Наличие на anti-EBNA 1 IgG установихме в 84.0% (95%CI:63.9%-95.5%, n=21), от които 85.7% (12/14) са мъжете и 81.8% (9/11) са жените. Както вече посочихме, с приложението на теста търсим атипични случаи и възможности за интерпретация. Един от пациентите, положителен в двата маркера срещу VCA и с наличие на anti-EBNA 1 IgG, ни насочи към търсене на реактивацията в допълнителни тестове. Повечето изследователи смятат, че серологичната диагностика не е достатъчно информативна при лица с имуносупресия или при лица с EBV свързани малигнени заболявания. При такива пациенти според литературата, може anti-EBNA-1 IgG да са в ниски титри, или да намаляват до изчерпване (Gärtner B. et al., 2000; Hess R., 2004). В 12.0% (95% CI:2.5% - 31.2%, n=3) от пациентите на различна възраст (19 г., 34 г. и 51 г.) не доказахме anti-EBNA-1 IgG антитела. Причината може да е загубата им на фона на медикаментозната терапия. Не можем да пренебрегнем и факта, че не всички преболедували лица образуват този тип антитела. По литературните данни в 5% от имунокомпетентните индивиди не се откриват anti-EBNA-1 IgG (Bauer G 2001). В проучване на De Paschale M et al (2009) отсъствие на anti-EBNA 1 IgG е установено в 9% от възрастното население. Авторите правят заключение, че наличието на изолирани anti-VCA IgG и отсъствие на anti-EBNA-1 IgG е свързано обикновено с минала инфекции, особено сред възрастните. По-високият относителен дял на пациенти с недоказани anti-EBNA1 IgG в нашето проучване, сравнено с литературните данни, може да се дължи на по-малката извадка и най-вече на факта, че това са пациенти с БХ на цитостатична терапия, често в комбинация с кортикостероиди. Според литературни източници, anti-EBNA-1 IgG се разглеждат в съотношение с anti-EBNA2. Хенле и сътр. (1987) установяват ниско съотношение anti-EBNA1/anti-EBNA2 при пациенти с БХ и с високи нива на антитела срещу VCA и EA. Това е още една възможност за проучване, която може да се окаже полезна в диагностичната практика.

В трета група положителни резултати доказахме в 70.8% (95% CI:48.9% - 87.4%) от изследваните, от които 77.8% (7/9) жени и 66.7% (10/15) мъже. Отрицателните пациенти имат средна възраст 16.5 г. (SD±17.24), значително по-ниска от средната

възраст на положителните пациенти - 40.06 г. (SD±22.12). Тези данни класифицират по-голяма част от случаите като инфекция с по-голяма давност. Наличието на anti-VCA IgM можем да обясним с реактивация, реинфекция или фалшива позитивност, а също и да не изключваме възможността за продължителното им персистиране при заразяване в по-късна възраст. От друга страна е възможно антитела срещу EBNA1 да се появяват и по-рано. По литературни данни (Chan K. et al 2001) при един пациент положителен за трите вида антитела е установена ниска IgG авидност и наличие на EBV ДНК в PCR. В друго проучване Nystad T et al (2007) открива в 42% от изследваните първична инфекция с наличието на anti-EBNA1 IgG. Авторите обясняват това с по-ранна поява на тези антитела и имат документирана EBNA1 сероконверсия 18 дни след появата на симптомите. От друга страна повишаване чувствителността на тестовете с използването на рекомбинантни синтетични пептиди води до по-ранното им откриване в хода на първичната инфекция. В същото време наличие на антитела срещу EBNA1 при първична инфекция може да е резултат на неспецифична реактивност. Това е потвърдено с приложение на тестове имуоблот при 12 от 18 пациенти с първична инфекция (Nystad TW et al 2007). Всички факти показват, че интерпретацията на резултатите при EBV инфекция в някои случаи е сложна и изисква познаване и използване на широк набор от маркери и методи. От пациентите в тази група 13 тествахме за авидност на IgG. Получихме пълно съвпадение на резултатите от двата теста (Табл.11).

**Таблица 11. Сравнително представяне на изследванията в теста за авидност на anti-VCA IgG и anti-EBNA1 IgG при лица от трета група**

Anti-VCA IgG авидност	Anti-EBNA 1 IgG	
	Положителен, n=9	Отрицателен, n=4
Ниска, n=4	0	4
Висока, n=9	9	0

Поради факта, че при диагностицирането на EBV инфекцията може да има различни серологични профили, които затрудняват поставянето на точна лабораторна диагноза, прилагането на тест за доказване на anti-EBNA1 IgG безспорно има значение при определяне стадия на инфекцията. Това е полезно в практиката, предвид широкото разпространение на вируса и значителната му роля в развитието на някои заболявания. Corrales I et al (2014), на базата на хемилуминисцентен имуноен анализ (CMiAs), предлагат за приложение панел от антитела (anti-VCA IgM / IgG и anti-EBNA1 IgG) за улесняване на лабораторната работа. Нашите данни показват, че ELISA-базираните тестове също са високочувствителни и специфични и могат да бъдат достатъчно информативни при първоначален скрининг и при особени серологични профили в диагностичната практика.

**Изводи:**

1. Изследването за наличие на anti-EBNA1 IgG може да бъде част от първичното изследване в комбинация с установяване на антитела срещу VCA. Атипични

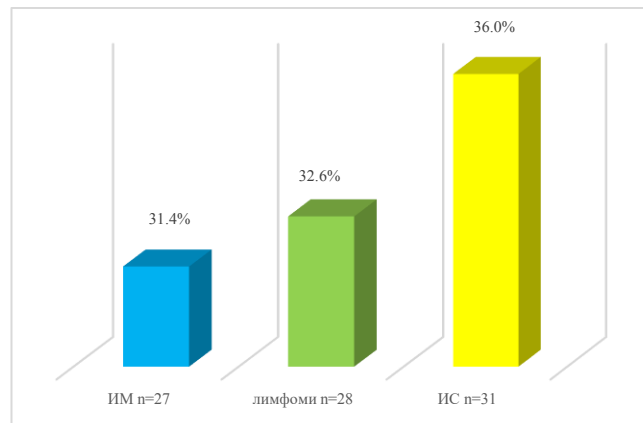
случаи от първоначалното изследване са възможни във всички възрасти и независимо от диагнозата, поради широкото разпространение на вируса.

2. При имunosупресирани пациенти и пациенти с лимфоми, липсата на anti-EBNA1 IgG изисква внимателна интерпретация и допълнително изследване с по-информативни методи.
3. Доказахме, че anti-EBNA1 IgG тестовете могат да идентифицират повечето от случаите с вероятна реактивация и тези с минали инфекции. Установихме пълно съвпадение при съпоставянето им с тестовете за определяне на IgG авидност.
4. В случаите с отсъствие на anti-VCA IgM и anti-EBNA 1 IgG трябва да се използват тестове за anti-VCA IgG авидност.

#### 4.3.3 Приложение на тестове за доказване на anti-EA-(D) IgM и anti-EA-(D) IgG

В изследването за антитела срещу D компонентата на ранния антиген (EA) на EBV (anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG) включихме 91 единични серумни/плазмени проби. При анализиране на резултатите изключихме трима от пациентите с клинични данни за ИМ, тъй като не установихме антитела срещу VCA, поради което не може да се приеме наличие на инфекция. По същата причина не включихме и двама пациенти от групата на имunosупресирани пациенти. В анализа участват 86 лица с различни видове лимфоми, в т.ч. с БХ и НХЛ, други имunosупресирани пациенти, основно с ОМЛ и като контролна група - лица с клинични данни за първична инфекция (ИМ) (Фиг. 15).

**Фигура 15. Относителен дял на пациентите изследвани в anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG в зависимост от клиничната диагноза**



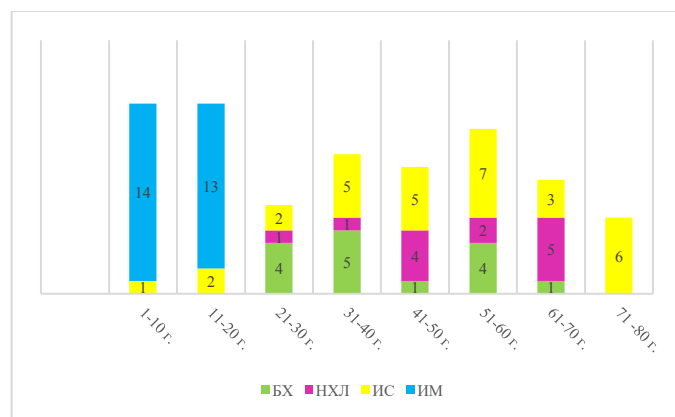
Средната възраст на всички изследвани е 36.69 (SD±22.59), разделени в 8 възрастови групи с равен интервал. Най-висок относителният дял на участващите пациенти има в групите (1 г. - 10 г.) и (11 г. - 20 г.). Основно тук попадат лица с клинична диагноза ИМ, следвани от групата 51 г. - 60 г., в която най-много са имunosупресирани пациенти (Табл. 12). Средната възраст е най-ниска в първа група - 11.07 (SD±5.94) и най-висока в трета – 50.06 (SD±19.73).

**Таблица 12. Разпределение на пациентите изследвани в anti-EA-(D) IgM / IgG по възрастови групи**

Възрастова група	N	Относителен дял(95%CI:)
1-10 г.	15	17.4% (10.1%-27.1%)
11-20 г.	15	17.4% (10.1%-27.1%)
21-30 г.	7	8.1% (3.3%-16.1%)
31-40 г.	11	12.8% (6.6%-21.7%)
41-50 г.	10	11.6% (5.9%-20.3%)
51-60 г.	13	15.1% (8.3%-24.5%)
61-70 г.	9	10.5% (4.9%-18.9%)
71 -80 г.	6	7.1% (2.6%-14.6%)
Общо	86	100%

Относителният дял на мъжете е 53.5% (95% CI:42.4% - 64.3%, n=46) и 46.5% (95% CI:35.7% - 57.6% n=40) на жените. При допълнителния преглед на извадката можем да отбележим, че в по-малките възрастови групи преобладават пациентите с клинична диагноза ИМ. С напредване на възрастта преобладават пациентите с различни видове лимфоми и други ИС. В групата на пациентите с различни видове лимфоми, тези с БХ са основно на възраст 21 г. - 40 г., докато тези с НХЛ преобладават във възрастови интервали 41 г. - 50 г. и 61 г. - 70 г. На фиг. 16 са представени отделно, тъй като са основните целеви групи в други наши изследвания. Други ИС лица има във всички възрастови групи, но преобладават във възрастов диапазон 51 г. - 60 г., и в последната възрастова група.

**Фигура 16. Разпределение на изследваните пациенти в anti-EA(D) IgM anti-EA(D) IgG тестове в зависимост от клиничната диагноза и възрастовата група**



Всички пациенти с различни видове лимфоми и друга имunosупресия са положителни в anti-VCA IgG теста и един пациент с БХ е положителен и в anti-VCA IgM теста. При пациентите с ИМ 88.9% (95%CI:70.8% - 97.6%) са положителни в anti-VCA IgM и 92.6% (95%CI:77.7% - 99.1%) - в anti-VCA IgG тестовете.

От всички изследвани пациенти, anti-EA(D) IgM положителни са 29.1% (95% CI:19.8% - 39.9%, n=25). Средната възраст на положителните пациенти е 17.04 г. (SD±15.34) и е сигнификантно по-ниска от тази на отрицателните пациенти - 45.72 г.

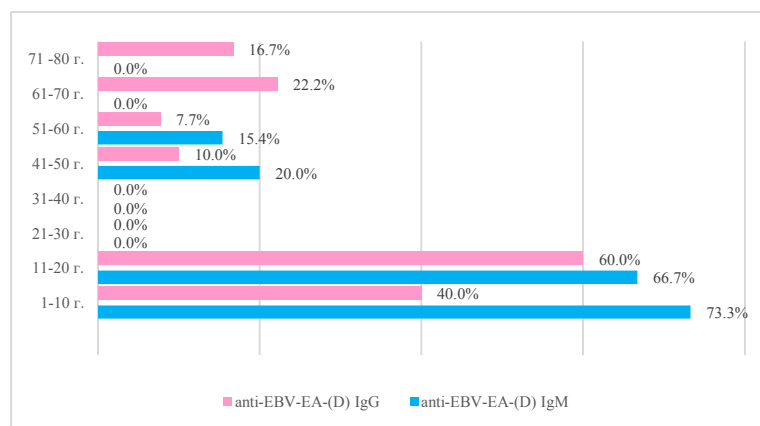
(SD±19.99)(p<0.05). Относителният дял на положителните резултати е най-висок при пациентите от първите възрастови групи, в които са регистрирани случаите на ИМ. Това доказва, че тези антитела се откриват най-вече при първична инфекция. В по-големите възрастови групи IgM положителните пациенти са във възрастов диапазон 41 г. - 50 г. и 51 г. - 60 г. В 4 от групите не установихме положителни резултати.

Anti-EA(D) IgG открихме в 23.3% (95% CI:14.8%-33.6%, n=20) от изследваните пациенти. Относителният дял на позитивните в теста е сигнификантно по-нисък от установеният в anti-EA(D) IgM (p<0.05). Отново най-висок относителен дял имат лицата от първите възрастови групи, в които са включени пациентите с ИМ. Следователно антитела срещу ранния антиген от двата класа се доказват най-вече при първична инфекция. По литературни данни антителата срещу EA(D) IgG се появяват в хода на първична инфекция, но не във всички пациенти, като титрите нарастват в първите 3 - 4 седмици и обикновено се задържат около 3 - 4 месеца. Също по литературни данни в 20% - 30% от здравите носители могат да персистират и по-дълго. Освен това тяхното наличие се свързва и с реактивация на инфекцията, поради нарушен контрол на имунната система върху вирусната репликация (De Paschale M 2012).

Установихме по-висок относителен дял - 22.2% (95% CI:2.8% - 60%) на IgG положителни лица от възрастова група 61 г. - 70 г. и 16.7% (95% CI:0.4% - 64.1%) в групата на 71 г.-80 г. В контекста на това можем да допуснем възрастта като фактор предразполагащ към реактивация на вирусната инфекция.

Съпоставихме резултатите от изследването на двата маркера с възрастта. В първите две възрастови групи значителен превес имат пациентите с антитела от клас IgM (Фиг.17).

**Фигура 17. Относителен дял на пациентите положителни в тестове за доказване на anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG в зависимост от възрастта**

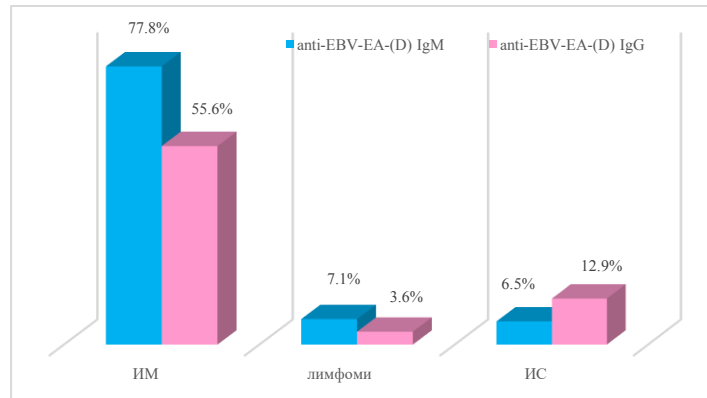


Сравнителният анализ на резултатите в зависимост от клиничната диагноза показва най-висок относителен дял на положителните за двата класа антитела пациенти с диагноза ИМ. При пациентите с различни видове лимфоми, anti-EA(D) IgM положителните се срещат по-често, докато при другите ИС преобладават положителните



резултати в anti-EA(D) IgG теста. Разликата не е статистически значима ( $p>0.05$ ). (Фиг.18)

**Фигура 18. Относителен дял на пациентите положителни в тестове за доказване на anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG в зависимост от клиничната диагноза**



От прегледа на резултатите при лицата с първична инфекция установихме, че относителният дял на положителните е очаквано висок и за двата маркера, съответно 77.8% в anti-EA (D) IgM и 55.6% - в anti-EA(D) IgG ( $p<0.05$ ). Всички anti-EA(D) IgG положителни пациенти са положителни и в теста за доказване на anti-EA(D) IgM. В литературата съществуват различни данни относно честотата на доказване на anti-EA(D) IgG. Според едно изследване установения относителен дял положителни anti-EA(D) IgG е по-висок (85%), в сравнение с установения от нас (De Paschale M 2012). В друго проучване, при пациенти с първична инфекция (anti-VCA IgM / IgG положителни), е установен близък до нашия относителен дял (57%). Авторите доказват по-висок относителен дял anti-EA(D) IgG положителни резултати при пациенти с първична инфекция с откриваеми единствено anti-VCA IgG (60%) (Chan KH. et al., 2001). Не открихме проучвания за установяване ролята на IgM антителата срещу EBV EA(D) при пациенти с ИМ, но нашите данни показват, че при първична инфекция те са по-информативни от IgG антителата и се откриват при по-голяма част от случаите. При съпоставяне на резултатите за наличие на антитела от клас IgM срещу двата маркера (VCA и EA-(D)) относителните дялове са близки, но не еднакви, съответно 88.9% (95% CI:70.8% - 97.6%, n=24) в anti-VCA IgM теста и 77.8% (95% CI:55.7% - 91.4%, n=21) - в anti-EA(D) IgM теста ( $p<0.05$ ). Те са в синхрон с литературните данни, според които антитела срещу EA(D) не се откриват във всички случаи на първично заразяване.

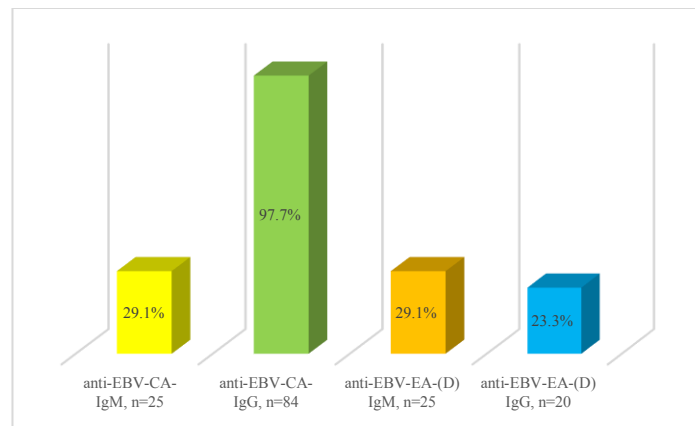
При тълкуването на резултатите от изследване на пациентите с различни видове лимфоми и други ИС пациенти, ключовият въпрос е доколко откриването на anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG може да се приеме за вирусна реактивация. Установено е, че при пациенти с БХ има повишаване на титрите на антителата към VCA и EA в сравнение с контролна група. Промененият серологичен профил дори предшества заболяването с няколко години и може да служи като прогностичен фактор според литературата (Levin L et al, 2012).

В нашето проучване всички пациенти с различни видове лимфоми и ИС са позитивни в anti-VCA IgG теста, което показва заразеност с вируса. Съобразно наличието

anti-EA(D) IgM или IgG вероятна реактивация на вирусната инфекция може да се приеме при 15.3% (95% CI:7.2% - 27.0%) включваща двете групи пациенти. При пациенти с минала инфекция (anti-VCA IgM / IgG положителни, anti-EBNA 1 IgG положителни), Chan K et al (2001) установяват 50% позитивност в anti-EA(D) IgG и само при един пациент откриват EBV ДНК. Други автори приемат сероконверсията на anti-EA(D), или количественото определяне в две серумни проби като по-добра възможност за доказване на реактивация (Wohlrabe P et al, 1989; Obel N et al, 1996). Според нашите данни, предвид стойностите на AI в теста за определяне на anti-EA(D) IgM и тези в RU/ml в теста за определяне на anti-EA(D) IgG, при 2 ИС пациенти установихме висок AI>5 пъти спрямо референтните стойности и при 1 пациент > 100 RU/ml. При положителните пациентите с различни видове лимфоми, стойностите и при двата маркера са по-близки до праговете на съответния тест, за разлика от установеното при ИС пациенти. В литературата до сега не са дефинирани прагови стойности при реактивация на EBV инфекцията. В тези случаи според нас и при ниско позитивните и при високо позитивните в тестовите пациенти можем само да допускаме това. В тази връзка, резултатите трябва да се сравняват с тези за определяне на EBV ДНК.

Сравнителният анализ на относителните дялове на положителните пациенти с наличие на антитела от клас IgM срещу двата вирусни антигена (VCA и EA-D) показаха еднакви резултати. Несъпадащи резултати получихме при 4 пациенти. При трима пациенти с ИМ и един с БХ доказахме позитивност само в anti-VCA IgM теста, докато при двама ИС пациенти и двама с различни видове лимфоми – позитивност само в anti-EA(D) IgM теста (Фиг.19).

**Фигура 19. Относителен дял на пациентите положителни в тестове за anti-EA(D) IgM/anti-EA(D) IgG и anti-VCA IgM/anti-VCA IgG**



Установихме, че двама от пациентите с първична инфекция са положителни само в теста за доказване на IgM anti-VCA и имат anti-EA(D) IgM. Има данни в литературата, че приложението на тестовите за доказване на anti-EA(D) могат да потвърдят първична инфекция в случаите на изолирани anti-VCA IgM или IgG модели. В нашето изследване лицата с откриваеми единствено IgG срещу VCA нямат антитела срещу EA-(D), което показва, че вероятно инфекцията е с по-голяма давност.

В заключение можем да кажем, че изследването за доказването на антитела срещу EA(D) самостоятелно или в комбинация с антитела срещу VCA се прави за първи път в нашата страна. На базата на анализа можем да направим следните изводи:

1. Използваните за рутинна диагностика тестове за определяне на антитела срещу VCA имат много по-добра диагностична стойност при дефиниране на първична инфекция, при скриниране на серологичния профил и при пациенти с диагнози асоциирани с EBV, в сравнение с антителата срещу EA-(D).
2. Според нас, определяне на антитела срещу EA-(D) може да се използва в случаите при изолирани anti-VCA IgM и anti-VCA IgG, но трябва да се потвърди с допълнителни изследвания.
3. Нашите резултати не подкрепят възможността за използване на тези тестове за установяване на реактивация на инфекцията. Необходимо е натрупване на още данни и съпоставянето им с тези от Real time PCR.

#### 4.3.4 Приложение на IgM Western blot анализ

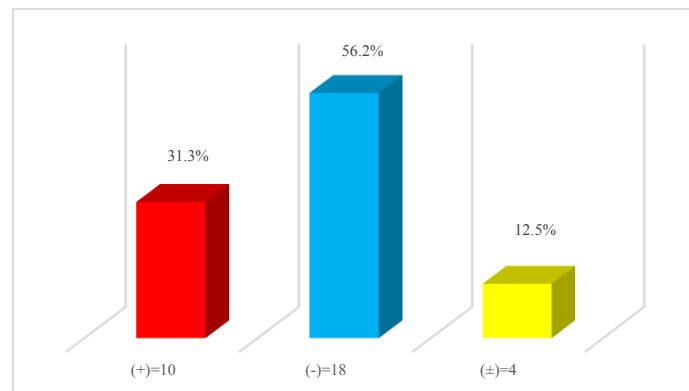
В IgM WB анализ изследвахме 32 серумни проби на пациентите с клинични данни за първична инфекция – първа група (n=11) и пациенти с предполагаема реактивация / реинфекция или неспецифична позитивност – втора група (n=21).

В първа група, която представлява 34.4% (95%CI:18.6%-53.2%) средната възраст е 2.63 г. (SD±1.96), (Mo)=1 и (Me)=1. Серологичния профил е: 9/11 (81.8%) anti-VCA IgM позитивни / anti-VCA IgG негативни, 2/11 (18.2%) - anti-VCA IgM позитивни / anti-VCA IgG позитивни.

Пациентите от втора група 65.6% (95%CI:46.8%-81.4%) са със средна възраст 35.58 г. (SD±22.18), (Mo)=22 и (Me)=27 и всички са положителни в двата визирани маркера.

Положителни резултати установихме в 31.3% (95%CI:16.1% - 50.%) от всички изследвани. Относителният дял на отрицателните резултати е значително по-висок (Фиг.20).

**Фигура 20. Резултати от изследванията в WB анализа**



Средната възраст на пациентите с положителен резултат в WB анализа е 28.6 г. (SD±24.27). Всички показват серологичен профил anti-VCA IgM положителни / anti-VCA IgG положителни. При трима пациенти се визуализира комбинация от антитела срещу двата антигена (VCA p19 и VCA gp125). При 6 от пациентите е на лице банд само в областта на VCA p19 и при един в областта на VCA gp125. В зависимост от клиничната диагноза разпределението е: 2 - с ИМ и 8 - с други диагнози. Половината от тези пациенти са на възраст над средната за положителните в анализа. В групата на пациентите с отрицателен IgM WB средната възраст е по-ниска - 17.28 г. (SD±22.40). Разпределение на положителните и отрицателните пациенти в WB анализ по целеви групи е представено на таблица 13. Не установихме статистически значима разлика в теста на Fisher при съпоставяне на двете групи ( $p > 0.05$ ).

**Таблица 13. Брой и относителен дял на резултатите в WB анализа по целеви групи**

Резултат	N I	Относителен дял (95%CI)	N II	Относителен дял (95%CI)
Положителни	2	18.2% (2.3%-51.8%)	8	38.1% (18.1%-61.6%)
Отрицателни	9	81.8% (48.2%-97.7%)	9	42.8% (21.8%-66.0%)
Неопределени	0	0	4	19% (5.4%-41.9%)

В първа група изследвани пациенти получихме преобладаващо отрицателни резултати (81.8%), и това са всички пациенти с изолирани anti-VCA IgM отговори. Изолираните IgM модели на реакция на имунната система при EBV инфекция не се срещат често, тъй като обичайно anti-VCA IgG се появяват почти едновременно с IgM антителата към същия капсиден антиген. В лабораторията по вирусология за първата половина на 2017 г., 14 пациента се позитивираха единствено в anti-VCA IgM теста и 9 от тях включихме в изследването. Откриването единствено на IgM-клас антитела се приема за много ранна инфекция и времето за вземане на серумната проба е от изключително важно значение. От друга страна наличието на антитела от клас IgM може да бъде фалшиво позитивно, вследствие кръстосани реакции, поликлонална активация на имунните клетки, автоимунен процес или други фактори установени в различни проучвания. Първична EBV инфекция в WB анализ беше потвърдена в 18.2% от изследваните, при които и двата класа антитела срещу VCA в ELISA бяха положителни. Следователно за по-точна диагностика на ИМ в ELISA значение има откриването и на двата класа антитела срещу VCA.

По-висока позитивност установихме във втора група от изследваните пациенти. Анализирайки резултатите и от останалите приложени тестове в 5 от случаите приемаме реактивация и/или реинфекция, поради наличие на anti-EBNA1 IgG и висока IgG авидност. Въпреки, че възрастта е съществен фактор и може да се използва при интерпретиране на резултатите трябва да се има предвид, че съществува възможност за по-ранно и по-късно заразяване. В конкретния случай имаме данни за реактивация на инфекцията при дете на 5 г. Останалите пациенти са над 37 г. Трима от пациентите (на

възраст 19 г., 22 г. и 28 г.) можем да интерпретираме като такива с първична инфекция, включвайки резултатите от всички тестове, в които са изследвани. Следователно WB анализът за доказване на IgM позитивност има допълнителна стойност при интерпретиране на случаите с вероятна реактивация или първична инфекция с диагнози различни от ИМ, но не е достатъчно самостоятелното му прилагане. От друга страна съществуват данни за неспецифична реактивност в IgM WB. При съпоставяне на резултатите с IFA при 75% от случаите Altuğlu I et al (2010) установяват фалшива позитивност, особено при положителен банд само в областта на VCA p19. Същите автори показват, че с увеличаването на интензитета на бандовете (1+ до 3+), честотата на реактивност в IFA за доказване на anti-VCA IgM се увеличава от 9.9% до 29.5% за положителните за p19 и от 24% до 85.7% - за положителните за gp125. В нашето изследване направено със същите тестове установихме преобладаваща позитивност в областта на VCA p19. Ние смятаме, че предвид на субективността в отчитането на IFA, по-добро сравнение може да се направи с PCR.

С неопределен блот са 19.0% от пациентите, които показаха слабо изразена позитивност в областта на VCAp19 и не могат категорично да се интерпретират, въпреки комбинацията и от други тестове. Както посочихме в анализа за anti-EBNA1 IgG може да се касае и за напреднала първична инфекция с по-ранна поява на тези антитела или неопределения блот тест да се дължи на фалшива реактивност. В тези случаи пациентите трябва задължително да се изследват в динамика с втора и трета серумна проба.

Отрицателните в WB анализ пациенти във втора група са 42.9% (95% CI:21.8% - 66.6%). В проучване сред 43 пациенти, положителни за двата вида антитела срещу VCA и EBNA1 Nystad T et al (2007) установяват, че 21 от тях са с минала инфекция. Използвайки WB при 18 от тези пациенти, в 10 потвърждават IgM позитивността, като в останалите случаи допускат фалшива IgM позитивност в ELISA. При трима откриват наличие на антитела срещу HCMV, с което обясняват anti-VCA IgM реактивността в ELISA.

В заключение можем да кажем, че в WB анализа изолираните IgM серологични модели и предполагаема първична инфекция не се потвърдиха. Според нас, причина може да бъде ранното вземане на серумната проба за изследване или фалшива позитивност в ELISA. В такива случаи смятаме, че изследване на втора серумна проба след 2 - 4 седмица може да потвърди или отхвърли първична инфекция. В съображение могат да влязат и други тестове, като определяне на антитела срещу EA(D) или хетерофилни антитела (при по-възрастни лица), чието откриване също се асоциира с първично заразяване. WB може да бъде полезен за установяване на фалшива реактивност и показва по-добри резултати в случаите за установяване на реактивация с наличие на anti-VCA IgM. За да твърдим това със сигурност е необходимо съпоставяне на резултатите с тези от доказване на EBVДНК репликация.

## 4.4 Приложение на Real time PCR при рискови пациенти

### 4.4.1 Изследване на пациенти с ИМ в Real time PCR

Диагностиката на ИМ се основава преди всичко на клинични критерии, данните от клинично-лабораторните показатели и рутинните серологични тестове за определяне на IgM и IgG антитела срещу EBV-VCA. В определени случаи рутинната серология се оказва недостатъчна, както установихме в предходния анализ. Това изисква използване на други тестове за потвърждаване или отхвърляне на първична EBV инфекция. Прилагането на PCR техниката не е включено като рутинна практика в лабораторната диагностика при първична EBV инфекция, главно поради високата цена и трудоемкост. Избрахме да приложим метода при пациенти с клинични и лабораторни данни за ИМ, за да оценим достатъчността на серологичните методи и да сравним количествените показатели с тези при рисковите пациенти – пациенти с различни видове лимфоми и с друга имуносупресия.

Изследвахме 40 плазмени проби на лица с дефинирана първична инфекция въз основа на клинични и серологични данни. Преобладават момчетата 70.0% (95% CI:53.5% - 83.4%, n=28). Изследваните момичета са 30.0% (95% CI:16.6% - 46.5%, n=12). Средната възраст е 8.6 г. (SD±6.54) и е по-ниска при момчетата (Табл.14).

**Таблица 14. Средна възраст на изследваните пациенти**

Пол	N	Min	Max	Mode	Median	Mean	Std. Deviation
Мъже	28	0.08	19	1	5.5	6.75	5.59
Жени	12	1	22	17	15.5	13.0	6.73
Общо	40	0.08	22	1	6.5	8.6	6.54

Формирахме 6 възрастови групи с 5 стъпков интервал, в зависимост от минималната и максимална възраст на изследваните (Табл.15).

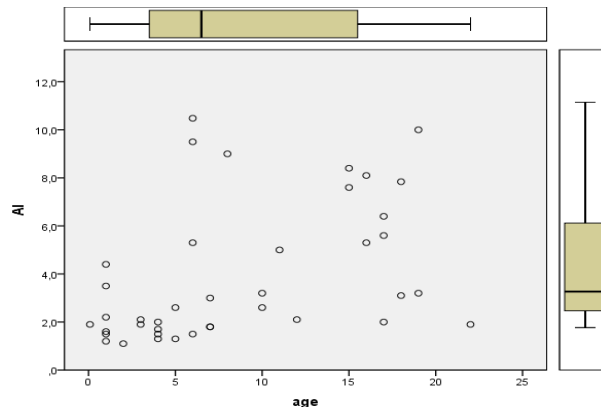
**Таблица 15. Относителен дял на пациентите с ИМ в зависимост от възрастта**

Възрастова група	N	Относителен дял, % (95%CI)
под 1 г.	1	2.5%(0.1%-13.2%)
1-5 г.	15	37.5%(22.7%-54.2%)
6-10 г.	10	25.0%(12.7%-41.2%)
11-15 г.	4	10.0%(2.8%-23.7%)
16-20 г.	9	22.5%(10.8%-38.5%)
21-25 г.	1	2.5%(0.1%-13.2%)
Общо	40	100.0 %

Почти всички пациенти са с увеличени лимфни възли, често в комбинация с фарингит (92.5%). Клинично-лабораторните данни са интерпретирани въз основа на референтните стойности на УМБАЛ „Св.Марина“, където са извършвани изследванията на всички пациенти. При преглед на лабораторните показатели, 64.7% (95% CI:46.5%-80.3%) от пациентите са с лимфоцитоза, повече от половината - 52.9% (95% CI:35.1%-70.2%) - и с моноцитоза. Високи стойности на АсАТ има при 71.4% (95% CI:53.7%-

85.4%) и почти половината са с високи стойности на АлАТ - 48.6% (95% CI:31.4%-66.0%). Най-често се открива серумна ЛДХ (92.9%), но не всички пациенти са тествани. Всички пациенти са положителни в ELISA anti-VCA IgM теста, което беше задължително условие. Изчислихме индивидуалния AI и го сравнихме с възрастта. По-високи стойности се установиха при пациентите от по-големите възрасти. При децата под 5 г. AI е в по-ниски стойности ( $p < 0.05$ ) (Фиг.21).

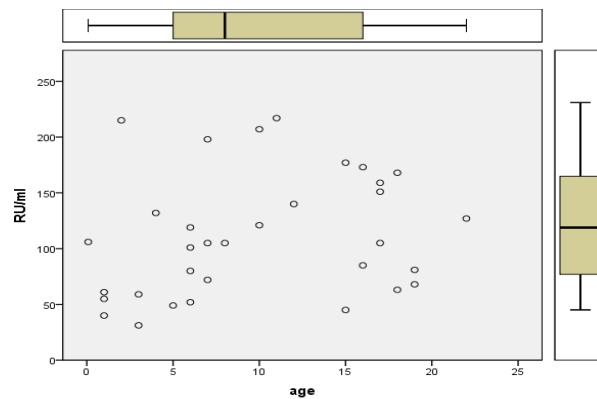
**Фигура 21. Сравнително представяне на AI на положителните в anti-VCA IgM теста пациенти с ИМ по възрасти**



От 16 (40.0%) пациенти с  $AI < 2$ , 12 (75.0%) са под 5 г., а при 1/2 от тях няма откриваеми anti-VCA IgG. По-малките деца имат по-слабо изразен имунен отговор, както и придобиват по-малко количество вирус. Това може да обясни ниската честота на ИМ в тази група (Crawford D 2006; Balfour H et al 2013) и вероятно по-ниските стойности в ELISA. Фактор, който трябва да се има предвид в интерпретацията на резултатите е времето за вземане на кръвната проба и активното търсене на медицинска помощ по повод клинична симптоматика. По-ранната лекарска консултация е характерна за този период, докато в по-големите възрастови групи това е отложено във времето. От друга страна наличието само на anti-VCA IgM може да се дължи на кръстосана реактивност с други вируси (HCMV, парвовирус B19), които също инфектират децата в ранна възраст, както и да са резултат от интерфериране с ревматоиден фактор или автоантитела. Вероятно неспецифичната реактивност може да се регистрира с невисок AI в ELISA.

Положителни в anti-VCA IgG са 82.5% (95%CI:67.2%-92.7%,  $n=33$ ) от изследваните. Отрицателните резултати са при пациенти от мъжки пол и от първа възрастова група. При децата до 5 г. отново се наблюдават по ниски стойности отчетени в RU/ml ( $p < 0.05$ ) (Фиг.22). Също така при тях по-често не се откриват тези антитела. Ниски стойности на anti-VCA IgG установихме при лицата с по-ниски стойности на AI в IgM анализа.

**Фигура 22. Сравнително представяне на положителните в anti-VCA IgG теста пациенти с ИМ в RU/ml по възрасти**



От изследваните 40 пациенти в Real-time PCR установихме позитивност в 75.0% (95% CI:58.8% - 87.3%, n=30). Всички са със серологичен профил anti-VCA IgM положителни и anti-VCA IgG положителни. Не установихме статистически достоверна разлика в положителните в PCR и в ELISA anti-VCA IgG (Pearson's= 0.672, p=0.412).

В проучване на Bauer Cet al. (2005) в плазмени проби е установена значително по-висока чувствителност на метода (94.9%) при пациенти със симптоматична серопозитивна първична инфекция. Близки резултати (80.0%) открихме в проучване направено в Nested PCR (Taleifard S et al 2015). Salehi H et al (2016) доказват 76% положителни в PCR пациенти с клинични данни за ИМ, от които 36% позитивират единствено в IgM теста срещу VCA, 80% - в anti-VCA IgG и 60% - в anti-EBNA 1 IgG. При интерпретиране на чувствителността на получените от нас резултати трябва да се имат предвид два фактора – естеството на клиничния материал и времето на вземане. В настоящото проучване работихме с плазмени проби, взети и съхранявани по правилата. Според литературата, резултатите от PCR метода са най-достоверни 1 - 2 седмици след началото на заболяването. С количествен PCR е изследвана връзката между вирусното натоварване и времето на поява на EBV ДНК, връзката с възрастта, клиничните и лабораторни данни. EBV ДНК се открива до 12-ти ден след проявата на симптомите и не се открива след 22 дни (Bauer C et al 2005). Бързо намаляване до неоткриваемо ниво на EBV ДНК в плазмата е установено също при проследяване на положителни пациенти за по-дълъг период от Fafi-Kremer S et al ( 2005). В плазмени проби авторите отчитат EBV ДНК в 1.4 - 3.3 log copies /ml с постепенно намаляване до неоткриваемо ниво между 15-ти и 19-ти ден. Същите доказват устойчиво високо вирусно ниво в слюнката, което се запазва продължително време (месеци, след инфекцията) и обяснява по-дългата инфекциозност на преболедувалите ИМ. В същото време има литературни данни за доказване на вирусна ДНК при пациенти със серологичен профил на минала инфекция. Понеже EBV може да се реактивира и при имунокомпетентни пациенти, възможно е тя да се открие и при здрави носители (Salehi H et al, 2016). Положителни резултати в здрави носители са наблюдавани в развиващите се страни с разпространение 7% - 13%, докато в развитите страни не е откривана в плазмата или серума на здрави, имунокомпетентни лица (Musacchio G et al, 2006).



В 25.0% (n=10) от положителните anti-VCA IgM пациенти предимно от първа и един от втора възрастови групи не установихме EBV ДНК в Real time PCR. Стойността на AI по-често е под 2. Трима от тях са положителни и в IgG теста. Тези данни потвърждават необходимостта от допълнителни изследвания при изолираните IgM профили и най-вече търсене на други причинители. Проучванията показват, че PCR методът е по-чувствителен в острата фаза на заболяването (Bauer C et al, 2005; Taleifard S et al, 2015), което поставя под съмнение изолираната IgM серопозитивност. Наличие на IgG антитела при трима от пациентите може да е поради напреднала остра инфекция, при което вирусната ДНК да е неоткриваема. В тези случаи за потвърждаване стадия на инфекциране може да се използват тестове за авидност на IgG или за търсене на EBNA1 IgG. Според други данни, наличието EBV ДНК в плазмата вероятно е свързано с тежестта на заболяването и с интензитета на клетъчните имунни реакции (Fafi-Kremer S et al, 2005).

EBV ДНК открихме при 83.3% (95% CI:51.6%-97.9%, n=10) от момчетата, чиято средна възраст е 14.2 г. (SD±6.73) и в 71.4% (95%CI:51.3%-86.8%, n=20) от момчетата със средна възраст 8.45 г. (SD±5.7). Получените резултати съвпадат с данните от ретроспективния анализ, където серологично потвърдените случаи с клинична диагноза ИМ са по-често при момчетата. В същият анализ установихме, че момчетата се заразяват по-рано и при тях по-често се поставя диагноза ИМ. Преобладават положителните лица от по-големите възрастови групи (p<0.05). Това се потвърждава и от по-високата средната възраст при тях - 10.4 (SD±6.42) (Табл.16).

**Таблица 16. Положителни в Real time PCR пациенти с клинична диагноза ИМ в зависимост от възрастта**

Възрастова група	N		Относителен дял, % (95%CI:)
под 1 г.	1	0	0
1-5 г.	15	7	46.7%(21.3%-73.4%)
6-10 г.	10	10	100%
11-15 г.	4	3	75.0%(19.4%-99.4%)
16-20 г.	9	9	100%
21-25 г.	1	1	100%
<b>Общо</b>	<b>40</b>	<b>30</b>	<b>75.0%(58.8%-87.3%)</b>

В литературата се посочва връзка между клиничната презентация на първичната инфекция и възрастта. ИМ се проявява по-често в юношеския период (Crawford H et al, 2006; Rickinson A, Kieff E, 2007) факт, който установихме и при нашите пациенти.

Според някои автори (Bauer C et al, 2005) съществува връзка между възрастта на пациента и вирусното натоварване. Те отчитат по-високи нива на вирусен товар при по-младите. Нашите резултати не показаха зависимост на количеството ДНК с възрастта, но трябва да се има предвид, че изследваните от нас пациенти са в по-тесен възрастов диапазон от този в посоченото изследване и на практика всички са в групата на младите.

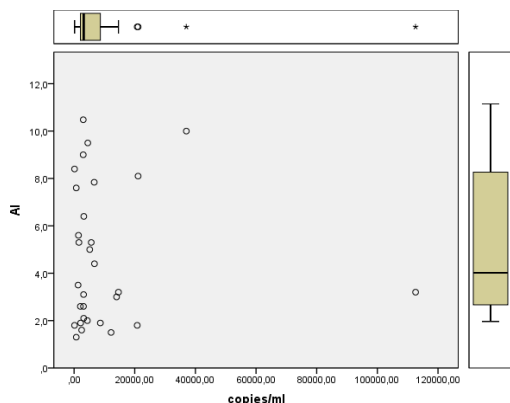
При положителните в Real time PCR пациенти преобладават тези с лабораторни данни за лимфоцитоза и високи стойности на АсАТ и АлАТ (Табл.17). Сравнявайки нашите данни с тези от Bauer C et al (2005) можем да потвърдим, че откриването на EBV ДНК показва по-ясна връзка с клиничните прояви на заболяването от останалите лабораторни показатели.

**Таблица 17. Характеристика на пациентите изследвани в Real time PCR**

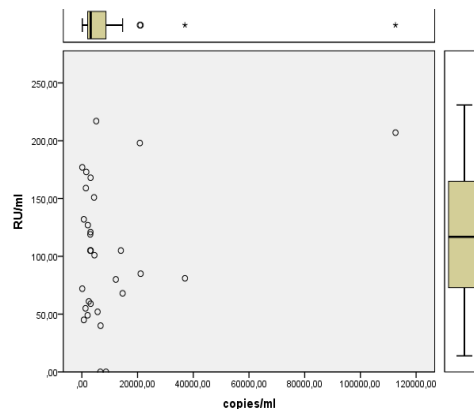
Променлива	положителни, n(%)	отрицателни, n(%)
Увеличени лимфни възли	30 (81.1)	7 (18.9)
Фарингит	28 (75.7)	9 (24.3)
Висока температура	9 (60.0)	6 (40.0)
Лимфоцити		
>44%	19(86.4)	3(13.6)
<20%	1(50.0)	1(50.0)
В норма	6(60.0)	4(40.0)
Липсват данни	4(66.7)	2(33.3)
Моноцити		
>9.5%	14(77.8)	4(22.2)
в норма	13(81.2)	3(18.8)
Липсват данни	3(50.0)	3(50.0)
ЛДХ		
>378U/L	9(69.2)	4(30.8)
в норма	1(100)	
Липсват данни	20(76.9)	6(23.1)
АсАТ		
>34U/L	21(84.0)	4(16.0)
в норма	7(70.0)	3(30.0)
Липсват данни	2(40.0)	3(60.0)
АлАТ		
>49U/L	16(94.1)	1(5.9)
в норма	12(66.7)	6(33.3)
Липсват данни	2(40.0)	3(60.0)

При съпоставяне на вирусния товар в copies/ml със стойностите на AI и RU/ml в ELISA не установихме зависимост между количествените стойности получени по двата метода (Фиг 23 - 24).

**Фигура 23. Съпоставяне на вирусния товар и AI при пациенти с ИМ**



**Фигура 24. Съпоставяне на вирусния товар и RU/ml при пациентите с ИМ**



От положителните в PCR пациенти с първична инфекция преобладават тези с количества между 2000 и 10 000 copies/ml - 40.0% (95% CI:24.9% - 56.7%, n=16), 7 (17.5%; 95% CI:7.3% - 32.8%) са под 2000 copies/ml, при 6 (15.0%; 95% CI:5.7% - 29.8%) между 10 000 и 40 000 copies/ml. Един пациент е с над 50 000 copies/ml. Използвайки количествените данни при тази група пациенти, която считаме за контролна в нашето изследване, може да подкрепим поставената от други автори клинична горна граница от 2000 copies/ml (Stevens S et al, 2002) и да ги приемем за значими при интерпретиране на резултатите от изследването на рисковите пациенти.

В заключение нашите проучвания при пациенти с клинично-лабораторни данни за ИМ показват, че рутинните серологичните методи трябва да останат като първо средство на избор при първична инфекция, но при необходимост да бъдат допълвани с такива за по-прецизна диагностика. Въз основа на проучванията за времето на откриваема вирусна ДНК в плазмата, ELISA може да се приложи в различни фази на заболяването с по-висока чувствителност в сравнение с PCR, поради факта, че има различни видове антитела, които се откриват в различните фази на EBV инфекцията (Salehi H et al, 2016). С внимание трябва да се подхожда при изолираните anti-VCA IgM модели, които в това проучване не показаха положителен резултат при определяне на EBV ДНК. Real time PCR е скъпа и трудоемка техника и нейното използване е оправдано при рискови групи пациенти и имунокомпрометирани такива, както и при неясни диагностични случаи.

#### 4.4.2 Изследване на пациенти с различни видове лимфоми в Real time PCR

Изследвахме 69 плазмени проби от пациенти с БХ и НХЛ от клиниката по хематология на УМБАЛ „Св.Марина“ - Варна и 10 проби на лица с БХ от клиниката по хематология от УМБАЛ „Г. Странски“ - Плевен Съпоставихме резултатите за наличие на антитела срещу VCA и вирусното натоварване в плазма в Real-time PCR. Лицата с НХЛ представляват 65.8% (95% CO:54.3%-76.1%, n=52) от общата извадка, а лицата с БХ - 34.2% (95% CO:23.9%-45.7%, n=27). По данни от НСИ, НХЛ се срещат по-често като заболявания в страната, отколкото случаите с БХ.

От пациентите с БХ мъжете представляват 55.6% (95% CI:35.3%-74.5%, n=15), жените - 44.4% (95% CI:25.2%-64.7%, n=12). Средната възраст е 39 г. (SD±16.37). При изследваните жени възрастта е по-ниска от тази при мъжете (Табл.18).

**Таблица 18. Средна възраст на изследваните пациентите с диагноза БХ**

Пол	N	Min	Max	Mode	Median	Mean	Std. Deviation
Мъже	15	7	60	59	50	42.8	SD±17.54
Жени	12	12	65	31	32.5	34.3	SD±14.05
Общо	27	7	65	31	39	39	SD±16.37

Изследваните пациенти с клинична диагноза НХЛ преобладават в проучването, поради по-голямата честота на клинични случаи в нашата популация. Отново мъжете са повече- 57.7% (95% CI:43.2% - 71.3%, n=30) от жените - 42.3% (95% CI:28.7% - 56.8%, n=22). Средната възраст на пациентите с НХЛ е по-висока от тази на пациентите с БХ. Жените с НХЛ имат по-висока средна възраст (Табл.19).

**Таблица 19. Средна възраст на изследваните пациенти с диагноза НХЛ**

Пол	N	Min	Max	Mode	Median	Mean	Std. Deviation
Мъже	30	23	76	64	48.5	51.1	14.33
Жени	22	31	78	57	60.0	59.3	10.63
Общо	52	23	78	64	55.5	54.5	13.42

Възрастта е зависима променлива при пациентите с БХ. При класифициране на пациентите по възрастови групи спазихме посочените в литературата данни за възрастовото преобладаване, което е от бимодален тип - между 15 г. - 34 г. и над 55 г. (Генова М и др, 2015). В нашата извадка минималната възраст е 7 г., а максималната – 65 г. Преобладават лицата на възраст между 35 г. - 54 г., но новооткритите лица са по-малко и това до известна степен се отразява върху резултатите. Независимо от това може да заключим, че БХ се среща по-често при по-младите (Табл.20).

**Таблица 20.Разпределение на пациентите с диагноза БХ в зависимост от възрастта**

Възрастова група	N	Относителен дял, % (95%CI)
Под 14 г.	3	11.1%(95%CI:2.4%-29.2%)
15-34 г.	9	33.3%(95%CI:16.5%-54.0%)
35-54 г.	10	37.0%(95%CI:19.4%-57.6%)
Над 55 г.	5	18.6%(95%CI:6.3%-38.1%)
Общо	27	100.0 %

Условно разделихме пациентите с НХЛ на две възрастови групи ≤45 и >45 г. В първата група попадат 25.0% (95% CI:14.0% - 38.9, n=13) от изследваните, а във втората - 75.0% (95% CI:61.1% - 86.0%, n=39). Повечето варианти на НХЛ се срещат по-често при по-възрастните пациенти, което съответства и на нашите данни.

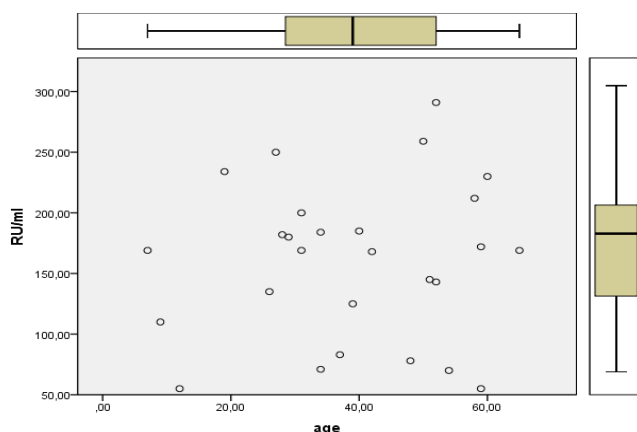
От пациентите с БХ преобладават случаите с NS - 81.5% (95% CI:61.9% - 93.7%, n=22), който е най-често срещаният хистологичен тип, но според литературата е по-малко свързан с EBV (Chang E et al, 2004). С MC са 14.8% (95% CI:4.2% - 33.7%, n=4), с LR - 3.7% (95% CI:0.1% - 19.0%, n=1). Преобладават пациентите от по-горните клинични стадии, като най-много са в стадий IVB - 35.0% (95% CI:61.9% - 93.7%, n=7).

При пациентите с НХЛ преобладават случаите на дифузен В едроклетъчен лимфом - 48.1 (95% CI:34.0% - 62.4, n=25), следвани от тези с периферен Т клетъчен лимфом - 15.4% (95% CI:6.9% - 28.1%, n=8) и фоликуларен лимфом - 13.5%(95% CI:5.6% - 25.8%, n=7). И в тази група също преобладават лицата от по-високите клинични стадии, най-вече от ШВ - 30.0% (95% CI:16.6% - 45.5%, n=12).

Всички пациенти с БХ са положителни в ELISA-anti-VCA IgG. Най-висок относителен дял имат тези със стойности над 101RU/ml.

Резултатите от изследването в зависимост от възрастта на пациентите са представени на фигура 25. Високи количествени стойности в ELISA теста има във всички възрасти.

**Фигура 25. Сравнително представяне на пациентите с БХ в зависимост от възрастта и количеството anti-VCA IgG в RU/ml**



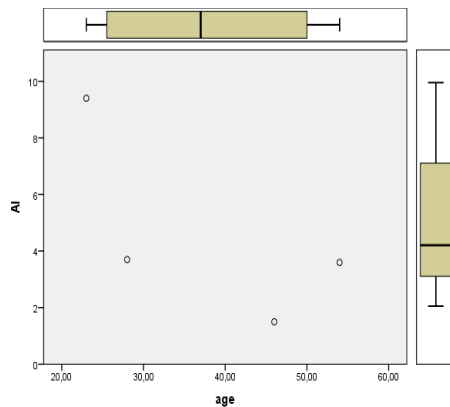
Високите стойности на антителата в изследваните проби може да се дължат на реактивация на вирусната инфекция или реинфекция, но тъй като не сме проследили пациентите в динамика с втора серумна проба, не можем да твърдим със сигурност.

При 24 от пациентите с БХ (88.9%, 95% CI:70.8% - 97.6%) не открихме anti-VCA IgM. Двама (на 59 г.) от пациентите показаха положителни резултати, от които единият е със стойност близка до праговата. Един пациент (на 34 г.) показва граничен резултат (сива зона). Една група от пациенти с БХ 55.6% (n=15) тествахме за наличие на anti-EA (D) IgM и anti-EA(D) IgG. При един пациент открихме антитела от клас IgM и при един - от клас IgG. В изследване за anti-EBNA 1 IgG включихме 25 пациенти и при 3 (12.0%) не установихме антитела, вероятно поради загубата им.

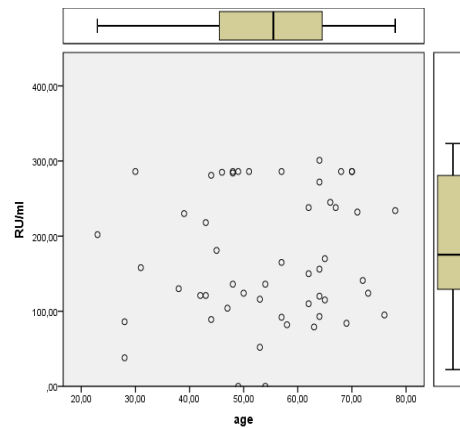
От пациентите с НХЛ положителни в ELISA anti-VCA IgM са 7.7% (95% CI:2.1% - 18.5%, n=4). Двама от тях са на възраст под 45 г. и двама – над 45 г. Положителни в ELISA anti-VCA IgG са преобладаващата част от изследваните - 96.2% (95% CI:86.8% -

99.5%, n=50). Един от пациентите показва положителен резултат единствено в anti-VCA IgM теста. При друг на възраст над 45 г., не открихме серологични данни за EBV инфекция. Количествените стойности за anti-VCA IgM и anti-VCA IgG са представени на фигури 26 и 27.

**Фигура 26. Сравнително представяне на AI при пациентите с НХЛ по възрасти**



**Фигура 27. Сравнително представяне на RU/ml при пациентите с НХЛ по възрасти**



При разпределението на пациентите в зависимост от нивото на anti-VCA IgG в RU/ml установихме най-висок относителния дял на тези със стойности над 201 RU/ml без връзка с възрастта.

В изследваните 79 пациенти, EBV ДНК установихме в 24.1% (n=19) от случаите. Преобладават пациентите с клинична диагноза БХ (40.7%) в сравнение с пациентите с НХЛ (15.4%),  $p < 0.05$  в тест на Fisher.

EBV се свързва в приблизително 40% от случаите етиологично с БХ и най-вече с вариант MC (Ambinder R et al, 1993; Chang E et al, 2004). В зависимост от хистологичният вариант ние установихме положителен резултат при 1/1 пациент с LR, при 2/4 - с MC и при 8/22 - с NS. Нашите данни са близки до данни за 30 новодиагностицирани случая с БХ в проучване в Рио де Жанейро. При изследване за наличие на свободна ДНК в плазма, авторите установяват позитивност в PCR в 43.0% от пациентите, предимно от високи клинични стадии (Musacchio J et al, 2006). Други автори откриват ДНК в плазма на 76% от EBV положителни пациенти с БХ преди терапия и в 66% при изследване на цяла кръв (Spasek M, 2011).

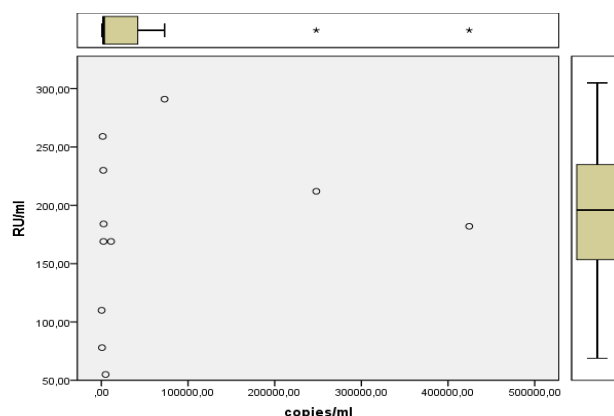
Количествените стойности при пациентите с БХ са в диапазон 500 – 424 477 copies/ml. Стойности  $>2000$  copies/ml има при 72.7% (95% CI:39.0% - 94.0%, n=8), а при трима от тях -  $>50\,000$  copies /ml. Възрастовите групи, в които влизат тези пациенти са различни, но за отбелязване е, че всички изследвани пациенти под 14 г. показват положителен резултат. Според разпределението по пол 41.7% (95% CI:15.2% - 72.3%, n=5) са жени и 40.0% (95% CI:16.3% - 67.7%, n=6) - мъже ( $p > 0.05$ ). Според данните от другите лабораторни тествания, повече от половината (6/11) положителни в Real time PCR пациенти са с лимфоцити  $<20\%$  и 7/11 – със стойности на ЛДХ  $>378$  U/L. (Табл.21).

**Таблица 21. Характеристика на положителните в EBV ДНК пациенти с БХ**

	положителни n(%)	отрицателни n(%)
Хистологичен подтип		
NS	8(36.4)	14(63.6)
MC	2(50.0)	2(50.0)
LR	1(100.0)	
Клиничен стадий		
IIA	2 (66.7)	1(33.3)
IIIB	2(40.0)	3(60.0)
IIIC		4(100)
IVB	1(100.0)	
IVC	4(57.1)	3(42.9)
***Липсват данни	2(28.6)	5(71.4)
Терапия		
На терапия	9(42.9)	12(57.1)
Без терапия	2(33.3)	4(66.7)
ЛДХ		
>378U/L	7(58.3)	5(41.7)
в норма	4(26.7)	11(73.7)
лимфоцити		
<20%	6(46.2)	7(53.8)
в норма	5(35.7)	9(64.3)

Не установихме корелация при пациентите с anti-VCA IgM положителен резултат и наличието на EBV ДНК. При 10 от EBV ДНК положителните пациенти резултатите в ELISA anti-VCA IgM са отрицателни и при 1 - в сива зона. Положителните пациенти в anti-VCA IgM (n=2) са отрицателни в Real time PCR. От положителните в теста anti-EA(D) 2-ма пациенти, откриваема вирусна ДНК в сравнително високи стойности (11 132 copies/ml) открихме при пациента с наличие на антитела от IgG клас. Не установихме връзка между количеството anti-VCA IgG в RU/ml и измерения вирусен товар в Real time PCR (Фиг. 28).

**Фигура 28. Сравнително представяне на количествените резултати в anti-VCA IgG в RU/ml и вирусния товар в copies/ml при пациентите с БХ**



В Real time PCR положителни резултати (в диапазон 674 – 221 333 copies/ml) установихме в 15.4% (95% CI:6.9% - 28.1%, n=8) от пациентите с клинична диагноза НХЛ. Относителният дял на положителните пациентите с НХЛ е близък до този, установен от Sinha M et al (2016) - 10%. Hassan R et al (2006) откриват по-висока степен на позитивност (68%).

При 2-ма от положителните пациенти вирусното натоварване е >50 000 copies/ml и при 6 - < 2000 copies/ml. Относителните дялове на положителните в двете възрастови групи е равен - 15.4%. Мъжете са 20.0% (95% CI:7.7% - 38.6%, n=6), жените - 9.1% (95% CI:1.1% - 29.2%, n=2) (p<0.05). В зависимост от хистологичния вариант, 37.5% (95% CI:8.5% - 75.5%, n=3) са с периферен Т-клетъчен лимфом и 12.0% (95% CI:2.5% - 31.2%, n=3) - с дифузен В-едроклетъчен лимфом, които спадат към групата на агресивните лимфоми. Един пациент е с клинична диагноза ХЛЛ и един - с фоликуларен лимфом от групата на индолентните лимфоми. Положителните пациенти, показали високи вирусни товари в Real time PCR са от групата на агресивните лимфоми (Табл.22).

**Таблица 22. Характеристика на положителните в EBVДНК пациенти с НХЛ**

	положителни n(%)	отрицателни n(%)
<b>Хистологичен подтип</b>		
дифузен В едроклетъчен	3(12.0)	22(88.0)
периферен Т клетъчен	3(37.5)	5(62.5)
фоликуларен	1(14.3)	6(85.7)
ХЛЛ	1(50.0)	1(50.0)
<b>Клиничен стадий</b>		
IIIВ	2(16.7)	10(83.3)
IVА	1(14.3)	6(85.7)
IVВ	3(42.9)	4(57.1)
***Липсват данни	2(16.7)	10(83.3)
<b>Терапия</b>		
На терапия	8(18.2)	36(81.8)

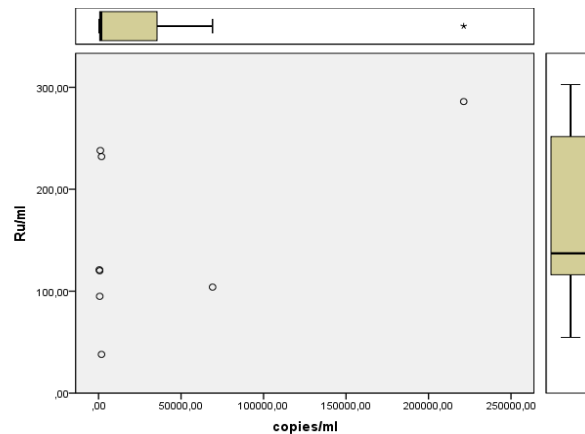


ЛДХ			
>378U/L	6(18.2)	27(81.8)	
в норма	2(10.5)	17(89.5)	
лимфоцити			
<20%	3(15.0)	17(85.0)	
в норма	5(18.5)	22(81.5)	

Всички пациенти положителни в Real time PCR, са отрицателни в anti-VCA IgM и положителни в anti-VCA IgG теста. При положителните anti-VCA IgM (n=4) и anti-EA(D)IgM (n=1), не се доказва EBV ДНК. При пациенти с НХЛ не открихме връзка между нивата на антителата срещу EBV, но в случаите с най-висока честота (дифузен голям В-клетъчен лимфом, фоликуларен лимфом и ХЛЛ) са установени антитела срещу EA(D) и увеличени титри на антителата срещу EBNA 1 и VCA свързано с по-висок риск (Teras L et al, 2015).

Ние не установихме връзка между количествените стойности на anti-VCA IgG RU/ml и вирусния товар в Real time PCR (Фиг.29).

**Фигура 29. Сравнителен анализ на количествените резултати в anti-VCA IgG RU/ml и вирусния товар в copies/ml при пациентите с НХЛ**



Според нашите резултати и литературните източници (Spacek M, 2011), можем да допуснем участието на EBV в патогенезата на различните видове лимфони при положителни в Real time PCR случаи. Това с по-голяма вероятност се отнася за тези с висок вирусен товар (Musacchio J et al, 2006). Нашите данни и данните на посочените изследователи подкрепят теорията, че EBV често се среща във връзка със случаите на НХЛ и БХ, което не трябва да се пренебрегва

В редица проучвания се доказва, че вирусната нуклеинова киселина присъства в повечето EBV свързани лимфони и не се доказва, или се открива в малък процент при несвързаните с EBV случаи (Hassan R et al, 2006; Musacchio J et al, 2006; Spacek M, 2011;

Kanakry J et al, 2013). От друга страна е установено, че плазмената EBV ДНК има прогностична полезност преди и след терапията на тази група пациенти, като данните корелират с тези получени в *in situ* хибридизацията. Real time PCR техниката е неинвазивен и бърз метод и може да се използва както за първичен скрининг при пациенти с различни видове лимфоми, така и за мониториране на заболяването и терапията. В интерпретиране на резултатите от PCR основен проблем са таргетите, които се използват от различните производители. Дискутабилни остават въпросите свързани с клиничния материал, дефиниране на значимите количества вирусна ДНК и в съответствие с това, кога да започне терапия (Stevens S et al., 2001; Berger C et al, 2001; Preiksaitis J et al, 2009). Някои автори приемат, че при изследване на серум или плазма има риск да се пропусне присъствието на клетъчно-свързан вирус. В нефракционирана цяла кръв са включени всички кръвни елементи, в които може да се съдържа EBV и най-добре отразява абсолютния вирусен товар (Stevens S et al, 2001; Berger C et al, 2001). Други автори предпочитат серум или плазма особено при оценка на риска от реактивация на вирусната инфекция след трансплантация (Aalto S et al, 2003). Има данни, които показват съгласуваност между наличие на плазмена EBV ДНК и положителните резултати в *in situ* хибридизация и имунохистохимия при пациенти с БХ (Musacchio J et al, 2006; Kanakry J et al, 2013).

На цитостатична терапия са 89.5% от положителните пациенти. При 5 от пациентите на терапия установихме високо ниво на EBV ДНК в количествен диапазон 69 000- 424 477 copies/ml. Следователно мониторинг на терапията при тези пациенти е важна част от лечебния процес. Чрез това изследване според някои изследователи могат да се идентифицират случаите с лош терапевтичен контрол (Musacchio J et al, 2006; Dinand V et al, 2015). От друга страна изследване преди терапията би било полезно за проследяване динамиката на вирусния товар и последващи терапевтични решения.

В заключение не установихме връзка между данните получени при приложение на серологичните тестове с тези в Real time PCR. При 18/19 пациенти с откриваема EBV ДНК, резултатите от anti-VCA IgM изследването са отрицателни. При 1 пациент стойностите са гранични (сива зона). При 6 от пациентите (4 с НХЛ) доказахме присъствие на anti-VCA IgM, като при 4 от тях количеството измерено в AI е над 2.0. Вирусна репликация не се доказва. Следователно наличието или отсъствието на anti-VCA IgM при тази група пациенти не може да се използва като индикатор за установяване на вирусна реактивация. Литературните данни също подкрепят тази теза (Obel N et al, 1996).

Много изследователи посочват, че при реактивация на EBV инфекция, титрите на антителата срещу VCA нарастват, както и че нивата им са повишени преди и по време на някои заболявания като БХ и БЛ. В едно проучване се установява корелация между титрите на anti-VCA IgG и вирусното натоварване в периферни мононуклеарни клетки при пациенти с БХ (Besson C et al 2006). Според нашите резултати от изследване в плазмени проби, положителните в Real time PCR пациенти имат количество на anti-VCA IgG преобладаващо над 101 RU/ml. Високи стойности (над 201 RU/ml) доказахме и при пациентите отрицателни в Real time PCR. Следователно ние не можем със сигурност да твърдим, че при пациентите с високи стойности на VCA антителата от клас IgG става въпрос за реактивиране на инфекцията, но бихме могли да го очакваме. Въз основа на

данните от нашето проучване смятаме, че серологичните резултати, независимо от нивото на AI и RU/ml при пациентите с различни видове лимфоми, не могат да служат като сигурни предиктори за установяване на реактивация на EBV инфекцията.

Пациентите с БХ и НХЛ са тествани и в останалите тестове в опит да установим подходящ серологичен маркер и метод за доказване на реактивация на вирусната инфекция, като по-достъпни и по-евтини, но не получихме убедителни данни. Двама положителни в anti-EA(D)IgM теста показаха отрицателни резултати в PCR. Висок вирусен товар установихме при пациент с БХ и положителен anti-EA(D) IgG резултат. Следователно Real time PCR е най-сигурният метод за доказване на вирусна реактивация и най-добрият начин за мониториране хода на заболяването и ефекта от терапията при потенциално рискови пациенти.

При интерпретиране на количествените показатели получени в Real time PCR като значими използвахме посочените от Stevens S et al (2002) критерии, според които за клинична горна граница се приемат 2000 copies/ml, установени при изследване на здрави EBV носители. От нашите изследванията сред пациенти с първична инфекция установихме количества между 2000 и 10000 copies/ml в плазма в преобладаващата част от случаите. Следователно можем да приемем количества от 2000 copies/ml за значими. От пациентите с положителни резултати 52.6% (95% CI:28.9% - 75.6%) са с количества над определената горна граница, а 29.4% (95% CI:9.1% - 51.2%) от всички са с количества над 50 000 copies/ml, които можем да класифицираме като високо рискови.

Анализирахме положителните в Real time PCR пациенти в зависимост от други клинични и клинично-лабораторни показатели – брой лимфоцити, ниво на ЛДХ в серум, хистологичен вариант и клиничен стадий. Преобладаващата част (n=11) от положителните пациенти са в по-напреднали клинични стадии (III и IV). Musacchio J et al (2006) откриват положителна асоциация между стадия на болестта по Ann Arbor и наличието на плазмена ДНК. Значителна част от нашите пациенти са от стадии с неоткриваема ДНК. От положителните пациенти 47.4% са с ниско ниво на лимфоцитите, 73.7% - с високи стойности на серумна ЛДХ. Данните обаче не показаха зависимост в Chi-square теста. Според нас връзката с клинично-лабораторните и клиничните данни трябва да продължи да се търси и в други проучвания. Тези критерии могат да бъдат използвани в преценка на това кои случаи да се мониторира в PCR.

#### **4.4.3 Изследване на други имunosупресирани пациенти в Real time PCR**

Всеобщо възприето е, че серологичните методи не са решаващи в диагностиката на EBV инфекция при имунокомпрометирани и имunosупресирани пациенти, поради дисфункция на имунната система и поява на атипични серологични профили и PCR метода се приема за по-достоверен. Имуносупресирани и имунокомпрометирани пациенти са във висок риск от реактивация на EBV и съответно риск от EBV асоциирани злокачествени заболявания, съпроводено с повишаване на вирусната репликация и броя на заразените с вируса клетки (Adler B et al, 2002). От друга страна се счита, че тези пациенти са изложени на риск от инфекция с различни щамове EBV (Yao Q et al, 1996).

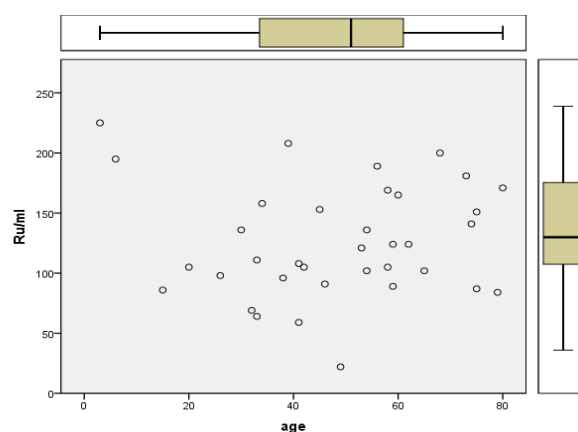
В Real-time PCR изследвахме 50 ИС пациенти, от които лицата с различни хематологични заболявания са преобладаващата част - 56.0% (95% CI:41.3% - 70.0%, n=28) на средна възраст 50.82 г. (SD±20.60). Пациентите след бъбречна трансплантация са 34.0% (95% CI:21.2% - 48.8%, n=17) със средна възраст 42.0 г. (SD±11.77) и 10.0% (95% CI:3.3% - 21.8%, n=5) са пациенти с автоложна трансплантация на стволови клетки със средна възраст 36.8 г. (SD±19.07). Плазмена проба от пациентите със стволовоклетъчна трансплантация е вземана еднократно в рамките на първия месец след манипулацията. От лицата с хематологични заболявания преобладават тези с диагноза остра миелоидна левкемия 82.1% (95% CI:63.1% - 93.9%). Разпределението по пол е пропорционално - 50% мъже и 50% жени. Средна възраст на изследваните лица е 46.4 г. (SD±18.33), по-ниска при мъжете - 45.1 г. (SD±19.98). Пациентите са в широк възрастов диапазон (Табл.23).

**Таблица 23. Средна възраст на изследваните ИС пациенти**

Пол	N	Min	Max	Mode	Median	Mean	Std. Deviation
Мъже	25	3	80	41	41	45.1	SD±19.98
Жени	25	6	75	33	49	47.2	SD±16.84
Общо	50	7	65	41	44	46.4	SD±18.33

Разполагаме с първоначални данни за серологичния статус в ELISA anti-VCA IgM и anti-VCA IgG на 72.0% (95% CI:57.5% - 83.8% n=36) от пациентите. Това са всички болни с хематологични заболявания, трансплантираните със стволови клетки пациенти и трима пациенти след бъбречна трансплантация. Всички изследвани лица независимо от възрастта са положителни в anti-VCA IgG, което показва заразеност с вируса. Преобладават пациентите със стойности над 101RU/ml. (Фиг.30).

**Фигура 30. Сравнителни резултати при ИС пациенти в RU/ml в зависимост от възрастта**



Положителни в ELISA anti-VCA IgM са двама пациенти на възраст 6 г. и 80 г. Лицата с хематологични заболявания и 3-ма с трансплантирани стволови клетки сме изследвали за наличие на anti-EA(D)IgM и anti-EA(D)IgG - 62.0% (95% CI:47.2% - 75.3%, n=31). Положителен резултат получихме в 6.5% (95% CI:0.8% - 21.4%, n=2) от случаите

в теста anti-EA(D)IgM и в 12.9% (95% CI:3.6% - 29.8%, n=4) в anti-EA(D)IgG. Всички положителни в anti-EA(D) теста са по-възрастни пациенти, отрицателни в anti-VCA IgM теста.

Наличие на EBV ДНК в Real-time PCR открихме в 14.0% (95% CI:5.8% - 26.7%, n=7) от изследваните. При двама пациенти количеството ДНК copies/ml е под 100. В останалите пет случая количествата са между 100 и 500 copies/ml (Табл.24).

**Таблица 24. Характеристика на ИС пациенти с откриваема EBVДНК в Real-time PCR**

диагноза	EBVДНК n(%)	отрицателни n(%)
бъбречно трансплантирани	0	17(100)
трансплантирани със стволови клетки	1(20.0)	4(80.0)
ОМЛ	6(25.0)	18(75.0)
Други хематологични заболявания	0	4(100.0)

Средната възраст на пациентите с откриваема вирусна ДНК в PCR е 52.4 г. (SD±33.57). Наличие на ДНК установихме и при най-малките пациенти - на 3 г. и 6 г. В единия случай пациентът е положителен и в теста за определяне на anti-VCA IgM. Най-високи стойности (приблизително 500 copies/ml) има при най-възрастния пациент – на 80 г.

Най-висок относителен дял на откриваема вирусна ДНК получихме при пациентите с хематологични заболявания. Всички са с клинична диагноза ОМЛ. Открихме малко литературни източници, които търсят връзка между левкемичните заболявания и участието на EBV. Описани са клинични случаи с откриване на EBVДНК предимно при пациенти с остра лимфобластна левкемия и хронична миелоидна левкемия, по-често в детска възраст, които се свързват с първична EBV инфекция (Look A, 1981; Haitham E et al, 2016). Има описани единични данни за повишен риск от остра лимфобластна левкемия при деца под 1 г., поради майчина EBV инфекция по време на бременността (Tedeschi R et al, 2007). Малко са данните за усложненията от реактивиране на EBV инфекцията при пациенти на химиотерапия. Едно проучване установява висок риск от често срещани се субклинични EBV-реактивации при пациенти с Т-клетъчна левкемия, при участие на HCMV и HHV-6. Авторите уточняват, че реактивациите на HHV-6 и EBV при тези пациенти са самоограничаващи се. Също така не е установена връзка с конкретно заболяване или с намалена преживяемост (Masao O et al, 2011). Установените от нас количества вирусен товар са много ниски. В контекста на проучването от Masao O et al (2011) ние не смятаме, че това би повлияло на прогнозата на заболяването. Необходимо е да се натрупат повече данни за ролята на EBV в хематологичните заболявания и рисковете от реактивация на вирусната инфекция, както и проследяване в динамика на положителните в серологичните методи пациенти.

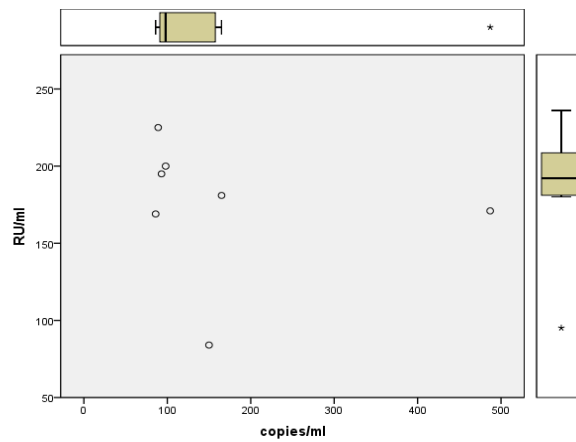
В литературата съществува значително повече информация за рисковете от EBV инфекция и нейната реактивация при имunosупресирани пациенти след HSCT и

пациенти след органна трансплантация (SOT). В нашето проучване изследваните трансплантирани лица в Real-time PCR са 22, с по-висок относителен дял на пациентите след бъбречна трансплантация - 77.3% (n=17) и по-малък при трансплантираните с HSCT - 22.7% (n=5). Ние не установихме EBV ДНК положителни пациенти след бъбречна трансплантация в Real-time PCR. По литературни източници честотата на PTLD е около 1% до 2.3%, като последните данни са получени при наблюдаване на значителен брой пациенти (n=1537) (Taylor A, 2005). Времето за вземане на плазмената проба след трансплантация и терапията са фактори свързани с риска, които може да са повлияли върху нашите резултати. При над 10-годишно наблюдение на голяма кохорта трансплантирани пациенти във Франция Caillard S et al (2012) установяват, че рискът от развитие на PTLD е висок в първата година след трансплантацията, и след 8-мата година. EBV се асоциира с ранните посттрансплантационни усложнения и се свързва с първия пик. По-висока честота на усложнения е доказана при серонегативни реципиенти, което означава, че децата са изложени на по-висок риск. В нашата извадка средната възраст е 42.0 г.(SD±11.77). Анализирайки тези фактори, въпреки че не открихме реактивация при бъбречно трансплантираните пациенти усилията за контрол и проследяване на това усложнение трябва да се превръщат в практика.

По литературни данни по-висок риск от развитие на PTLD съществува при алогенна трансплантация на HSCT ( Meijer E et al, 2002; Styczynski J et al, 2013). Също така е установено, че първичната EBV инфекция се асоциира с по-висок риск (Anderson J, 2012; Dharnidharka V et al, 2012). Нашите данни са предимно от изследване на пациенти в УМБАЛ “Св.Марина“ с автоложна трансплантация. В тези случаи рискът от реактивация е незначителен и настоящите стандарти не включват мониториране на EBV ДНК (Allen U et al, 2002; Styczynski J et al, 2009; Styczynski J et al, 2016). Ние сме изследвали сравнително малко пациенти, но плазмена EBV ДНК открихме при един пациент на 6 г., изследван в края на първия месец след трансплантацията и не е проследяван по-късно. Първоначалният серостатус показва данни за заразяване с EBV и не дефинира първична инфекция. Серологични изследвания месец по-късно показват anti-VCA IgM положителен и anti-VCA IgG положителен профил. Пациентите с предстояща автоложна трансплантация трябва да бъдат тествани за регистриране на първоначалния серостатус, особено ще се отнася до млади хора. Наблюдението според нас трябва да продължи, с особено внимание при серонегативните случаи. Интерпретиране на данните трябва да става в зависимост от имунния статус на пациента поради факта, че имуносупресията може да забави хуморалния отговор към EBV-антигените и да не се образуват IgM антитела. В съображение трябва да влезе и наличие на хемотрансфузии, с които титъра на IgG антителата се увеличава за сметка на пасивно придобитите. В тези случаи методът на избор е Real time PCR.

От пациентите с откриваема ДНК, един е положителен в anti-EA(D) IgG. Не открихме вирусна ДНК в останалите положителни в теста EA(D) пациенти. Не установихме връзка между стойностите на anti-VCA IgG в RU/ml и вирусния товар (Фиг.31)

**Фигура 31. Сравнителни количествени резултати при ИС пациенти в anti-VCA IgG RU/ml и Real time PCR в copies/ml**



В заключение, изследванията с Real time PCR са важна част от хода на диагностичния процес при имunosупресирани и имунокомпрометирани пациенти. Мониторингът за наличие на вирусна ДНК при пациенти след трансплантация ще подпомогне ранното идентифициране на рисковите пациенти и ще предотврати усложненията. EBV е в известна степен negliжиран, без това да е основано на достатъчно доказателства.

## 5. ИЗВОДИ, ПРЕПОРЪКИ И ПРИНОСИ

### 5.1 ИЗВОДИ

#### 5.1.1 Ретроспективно проучване

1. Данните от различните проучвания показват динамика в серопозитивността на населението, което налага проследяване и анализиране на заразеността в различните региони на страната за дефиниране на промените в степента на заразеност на населението и факторите, които влияят върху това. Установената от нас средна серопозитивност (83.0%) е по-висока от установената в предходни проучвания. Повишаване на средната серопревалентност вероятно се дължи на мащаба на проучването и на по-подходящите методи за лабораторно изследване.

2. EBV сероконверсията е възрастово обусловена и в настоящото проучване е анализирана връзката между възрастта на изследваните и серопозитивността. Данните сочат, че с напредване на възрастта над 90% от населението е инфектирано.

3. Високата степен на серопозитивност в нашия регион и възможността от реактивация на вируса при определени условия, най-вече при имуносупресия, налагат мониторингови изследвания за ранно откриване на усложнения.

4. Преобладаващият относителен дял на изследваните лица в по-млада възраст означава, че EBV се търси във връзка с възможна първична инфекция, но поради наличието на висока заразеност не трябва да се подценява ролята му за развитие на малигнени и автоимунни заболявания.

5. Установихме по-висока честота на първична инфекция в ранна детска и късна училищна възраст. След 35 г. първичното заразяване се среща много по-рядко. Предвид това, първична инфекция в по-големите възрасти трябва да се потвърждава и с други методи.

6. Установихме разлика в началото на първичното заразяване свързана с пола, като момчетата преобладават в по-малките възрастови групи, а момичетата в юношеския период. Тези данни могат да бъдат полезни в клиничната практика за идентифициране на риска от развитие на ИМ.

7. Установената висока серопозитивност сред жените в детеродна възраст показва, че рискът от инфектиране по време на бременност и вътреутробно заразяване на плода е малък. Не трябва да се подценява възможността от ранно постнатално заразяване на бебетата след изчерпване на пасивните майчини антитела при целуване на бебетата и възможността за заразяване от серонегативни млади майки с първична EBV инфекция.

#### 5.1.2 Проспективно приложение на тестове за доказване ролята на anti-EBNA 1 IgG, авидност на anti-VCA IgG, anti-EA(D)IgM / IgG и WB анализ.

Диагностиката на EBV инфекцията се извършва предимно със серологични тестове на базата на EIA. В нашите лаборатории се доказват основно антитела срещу VCA от клас IgM и IgG. Наличието на положителни резултати в двата теста и клинични данни за ИМ може да се приеме като достатъчно за потвърждение на диагнозата. Тези



профили обхващат по-голямата част от случаите в практиката. При неголям брой от случаите имаме различни серологични профили, с доказан един положителен маркер или два, но в комбинация с диагноза и възраст, пораждаат съмнения. В тези клинични случаи е необходимо потвърждение на резултатите. В диагностиката на EBV съществуват търговски тестове за доказване на антитела срещу много от неговите антигени. Комбиниране на маркери и методи при лабораторно неясни случаи е полезно в бъдеще за клиничната практика. В това проучване оценихме ролята на различни серологични методи и маркери, за да определим полезността им в интерпретацията и за по-добра диагностика. На базата на данните можем да направим следните изводи:

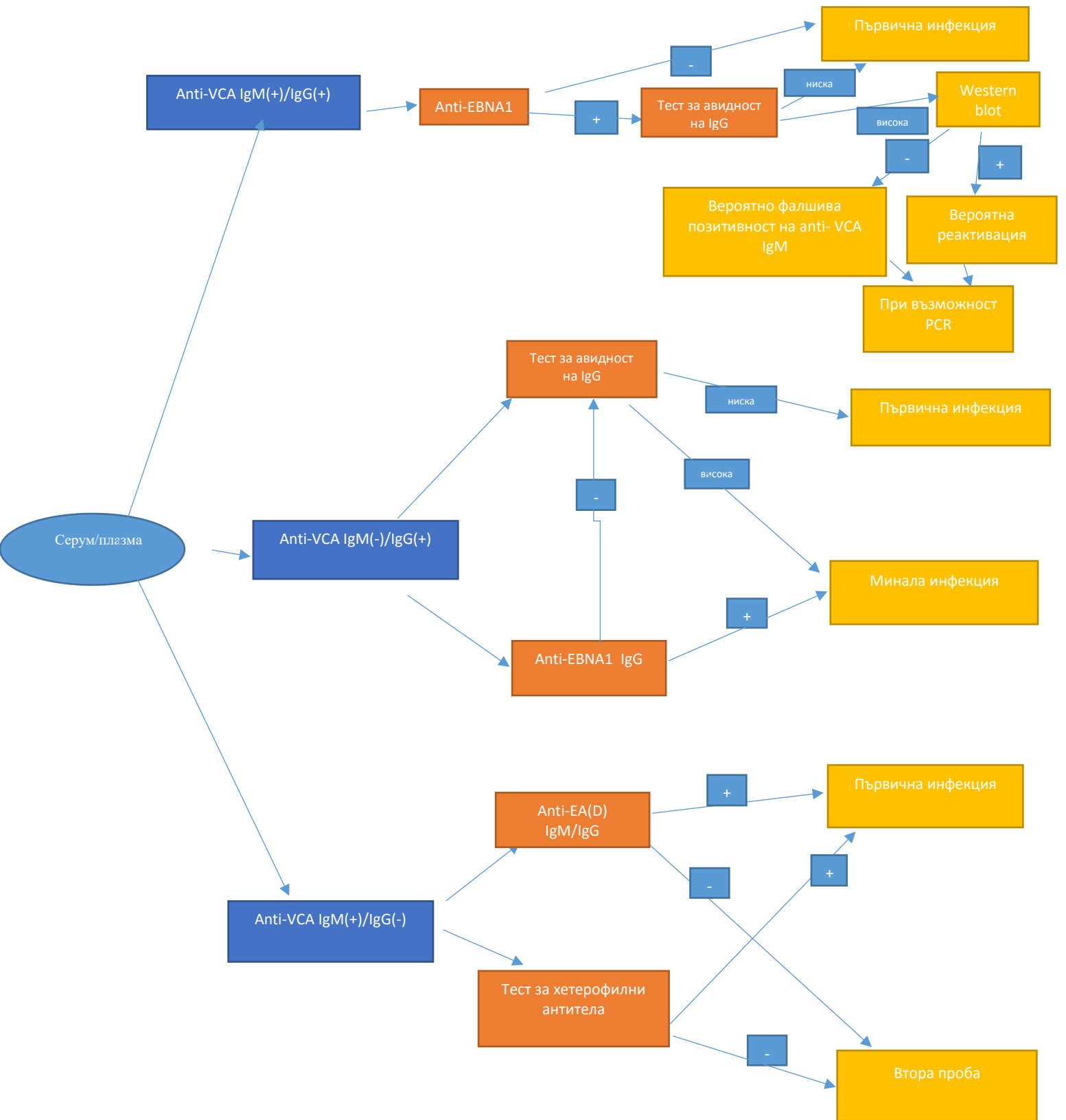
1. За диагностиката на EBV инфекцията съществуват много възможности. Има и много възможности за интерпретация на получените резултати. За установяване на първична инфекция нашите данни потвърждават общоприетата практика за определяне на IgM и IgG срещу VCA.
2. Тестовите за доказване на anti-VCA IgG авидност дават добра информативност при уточняване на пациенти със серологични профили, разминаващи се с клиничната диагноза и в случаите, когато не се откриват anti-VCA IgM. Могат да се използват и за отдиференциране на остри инфекции от вероятни реактивации.
3. Тестовите за доказване на anti-EBNA1IgG е желателно да присъстват като част от първоначалния пакет от изследвания. Те дефинират минала от остра инфекция, но трябва да се има предвид спецификата в имунния отговор към тези антитела и да се комбинират с други маркери в зависимост от резултата.
4. Според нашите данни серологичните маркери са несигурни в случаите, когато се търси реактивация на EBV инфекцията. Не получихме достатъчно надеждни резултати при съпоставянето на различните тестове, които използвахме. При наличие на anti-VCA IgM във възрастни и при пациенти с по-вероятна реактивация, според нас, може да се използва WB анализ за доказване на IgM, след отхвърляне на първична инфекция в тестовите за IgG авидност или anti-EBNA1IgG. Данните от серологичните изследвания като базисни би следвало да се съпоставят с изследвания за доказване на EBV ДНК, за да може да се потвърди реактивация на инфекцията в случаите на де-ново anti-VCA IgM и anti-EA (D) позитивност. От друга страна реактивация на EBV инфекцията се среща и при имунокомпетентни лица. Акцентиране върху възможностите за това трябва да става съобразно клиничната картина и имунния статус на пациента.
5. Въпреки нашите данни, ролята и значението на anti-EA(D), като маркери за реактивация на инфекцията не трябва да се отхвърля категорично. Изследванията трябва да продължат до натрупване на достатъчно доказателства.
6. В проучените от нас случаи с необичайни серологични профили в сравнение с клиничната диагноза, като тези с наличие на единствено anti-VCA IgG позитивност в съчетание с възраст, в която най-често настъпва първична инфекция, пациентите с наличие на anti-VCA IgM във възрастни, в които по-рядко настъпва първично заразяване, пациентите с БХ и НХЛ, не са преобладаващи в диагностичната практика. За сега малката извадка не позволява по-сериозна статистическа интерпретация. В същото време диагностичните решения за всеки конкретен

пациент имат важно значение в клиничната практика и епидемиологията. При интерпретиране на конкретните резултати трябва да се използва индивидуален подход за всеки пациент съобразно диагнозата, възрастта, серологичния профил. Особено значение също има имунния статус на пациента и резултатите от другите клинично-лабораторни изследвания.

7. Несъмнено серологичните тестове имат своето място и роля при EBV свързаните заболявания като базисни и не трябва да се подценяват. Те остават като първа стъпка в лабораторната диагностика и могат да бъдат добър ориентир за определяне на следващите диагностични решения.

### **Диагностичен алгоритъм за установяване на първична EBV инфекция**

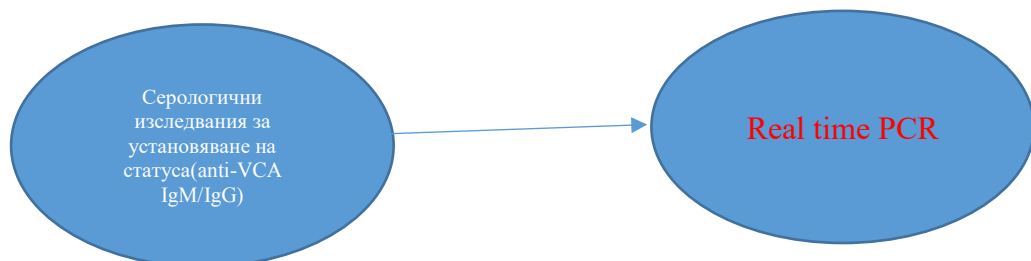
Въз основа на нашите изследвания предлагаме диагностичен алгоритъм за установяване на първична инфекция при различни anti-VCA IgM / anti-VCA IgG профили, които първично се тестват в повечето от лабораториите в нашата страна. Въпреки, че комбинацията от антитела срещу VCA, anti-EBNA1 IgG, anti-EA(D) и хетерофилни антитела се препоръчва за диагностициране на първично заболяване (Klutts J et al, 2009), ние смятаме, че нашият модел може да реши по-голямата част от лабораторните случаи. При избора на възможност сме се съобразили със специфичността на всеки маркер и неговата стойност в оценката на EBV серологичния статус на пациента. В тази връзка сме ограничили използването на теста за доказване на хетерофилни антитела. Създавайки диагностичния алгоритъм сме използвали данните от нашите изследвания, стандарта на Великобритания и основан на доказателства подход от широкомащабно проучване на различните серологични модели (Klutts J et al, 2009). Моделът може да бъде приложим във всички вирусологични и серологични диагностични лаборатории в страната, но изисква поддържане на допълнителни тестове.



### 5.1.3 Приложение на Real time PCR

1. Серологичните изследвания остават подходящи за лабораторна диагностика на първична инфекция. Тяхното интерпретиране трябва да е съвместно с клинично-лабораторните и клиничните данни, както и да включва допълнителни маркери за изследване.
2. Първичният скрининг с прилагане на серологичните методи за наличие на anti-VCA IgM и anti-VCA IgG трябва да бъде първо средство на избор и да бъде включен в медицинските стандарти в диагностиката на различните видове лимфоми.
3. Всички новооткрити пациенти с различни видове лимфоми и серологични данни за EBV инфекция трябва да бъдат тествани за наличие на плазмена EBV ДНК в Real time PCR. Данните могат да служат като биомаркер за хода на протичане на заболяването и за мониториране на терапията.
4. Необходимо е да се формулират критерии за мониторинг на EBV реактивацията при рисковите пациенти от мултидисциплинарен екип и въз основа на научните данни.
5. От изследванията на ИС пациенти потвърдихме, че най-добрия метод за установяване на реактивация е Real time PCR. Серологичните тестове, вкл. anti-EA(D) IgM и anti-EA(D) IgG, високи количества на anti-VCA IgG и отново поява на anti-VCA IgM не са достатъчно показателни и надеждни при всички пациенти.
6. Изследвания за установяване на серологичния EBV статус на донор и реципиент трябва да предхождат всяка трансплантация. Проследяването за установяване на реактивация след трансплантация трябва да се прави с Real time PCR в първите месеци.
7. Необходимо е включване на Real time PCR за посттрансплантационно мониториране и създаване на критерии основани на доказателства за приоритетно изследване на определени потенциално рискови групи.

### Установяване на реактивация на EBV при ИС пациенти и пациенти с лимфоми



## 5.2 Препоръки

1. Проучванията за началото на заразяване трябва да продължат и да бъдат анализирани в контекста на факторите, които влияят върху това. От една страна това ще подпомогне разработване на мерки за профилактика, от друга ще определи рисковите групи по отношение на EBV асоциираните заболявания. Съществува значителен брой данни за разработване и проучване на ефекта от профилактични ваксини, които да бъдат прилагани при серонегативни реципиенти на органи и HSCT.

2. Във връзка с трансплантациите на SOT и HSCT да се има предвид, че младите хора и децата не е задължително да бъдат заразени с вируса, което налага необходимост от регистриране на серостатуса.

3. Изчерпване на майчините антитела в първите месеци и периодичното излъчване на вируса със слюнката поставят в риск новородените от ранно инфектиране. Твърде разпространената практика за целуване на бебетата по устата и други широко разпространени практики допускат трансмисия на вируса чрез орофарингалните секрети, което налага повишаване на здравната култура на младите майки за превенция на ранното заразяване.

4. Наличието на серонегативни жени в по-късна детородна възраст (около 6.0%) и на жени със серологични данни за първична инфекция (17%) представлява риск по време на бременността и може да се отрази върху развитието на плода. Въпреки малкото данни за участието на вируса в неонаталната патология, заразяване с него трябва да се допуска и да се търси, след изключване на най-честите инфекциозни причинители.

5. Предлагаме в медицинските стандарти по хематология да се включи първичен серологичен EBV скрининг на потенциално рискови групи, имunosупресирани пациенти и пациенти с различни видове лимфоми.

6. Предлагаме в медицинските стандарти по хематология да се включи изследване в динамика в Real time PCR на серопозитивните лица.

7. Предлагаме въвеждане на скринингово изследване на донор - реципиент при костно-мозъчна и органна трансплантация и мотиториране в Real time PCR в първите 6 месеца след трансплантацията за дефиниране на рисковите пациенти, и предотвратяване развитието на посттрансплантационен лимфопрлиферативен синдром и други усложнения поради вирусна реактивация, първична инфекция и/или реинфекция.

## **6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Приноси с оригинален характер**

1. Направено е широкомащабно сероепидемиологично проучване върху разпространението на инфекцията с Epstein-Barr virus (EBV) сред населението в Североизточна България.
2. Анализирани са тенденциите в разпространението на вирусната инфекция за 7 годишен период.
3. Дефинирано е влиянието на възрастта и пола върху началото на първичната инфекция.
4. Проучена е ролята на различни комерсиални ELISA-базирани серологични маркери при пациенти с различни профили в имунния отговор при първична EBV инфекция.
5. Дефинирани са възможностите на разширен набор серологични маркери за изследване в зависимост от първичните серологични профили на пациентите, възрастта и клиничната диагноза.
6. Приложен за първи път в страната Real time PCR метод в диагностиката на EBV при пациенти с първична инфекция.
7. Приложен за първи път в страната Real time PCR метод сравнително със серологичните маркери при дефиниране на реактивация на инфекцията при пациенти с Болест на Ходжкин, Неходжкинови лимфоми и други имunosупресирани и трансплантирани пациенти.

### **Приноси с потвърдителен характер**

1. Потвърдена е ролята на серологичните методи в диагностиката на първичната EBV инфекция.
2. Потвърдена е необходимостта от приложение на Real time PCR, като метод на избор при установяване на вирусна реактивация при пациенти под имunosупресия и различни видове лимфоми.

### **Приноси с приложен характер**

1. Оценени са възможностите за приложение на различни методи и маркери в лабораторната диагностиката на EBV инфекциите при различни групи пациенти.
2. Посочени са предимствата на всеки от тях за приложение при пациенти с различни anti-VCA серологични профили с цел по-коректна и добра лабораторната диагностика.
3. Изработен е диагностичен алгоритъм от серологични възможности за установяване и потвърждаване на инфекция с EBV, който може да се използва от всички лаборатории в страната.

## **7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.**

1. Ц. Костадинова. Лабораторна диагностика на EBV. *Варненски медицински форум*, 2015,4 (3):460-465

2. Ц. Костадинова, Л. Иванова, Т. Райков. Роля на EBV в човешката патология. *Варненски медицински форум*, 2015,4 (3):466-475

3. Ts. Popova, T. Todorova, G. Tsankova, L. Ivanova, T. Raykov, N. Ermenlieva, E. Georgieva. Epstein-Barr virus – molecular basis for malignant transformation. *Scripta Scientifica Medica*, 2016 ; 48 (1): 11-15

4. Ts. Kostadinova, L. Ivanova, T. Raykov, Z. Stojkova, G. Tsankova. Seroprevalence of Epstein-Barr Virus in North-Eastern Bulgaria. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 2016,32: 33-38

### **СЪОБЩЕНИЯ, ИЗНЕСЕНИ НА НАУЧНИ ФОРУМИ**

1. Kostadinova Ts, T. Todorova, G. Tsankova, L. Ivanova, T. Raykov, N. Lodozova, E. Georgieva. Pathogenesis of Epstein-Barr virus infection. 6th Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection. Thessaloniki, Greece, 2015, November 13-15.

2. Ts. Kostadinova, L. Ivanova, T. Raykov, Z. Stojkova, G. Tsankova. Seroprevalence of Epstein-Barr Virus in North-Eastern Bulgaria - *Fourth Congress of Virology (Days of Virology in Bulgaria) with International Participation. Sofia, 2016, May 18-20.*

3. Ts. Kostadinova, L. Ivanova, T. Todorova, Zh. Stoykova, N. Ermenlieva, G. Tsankova, D. Tsaneva. Relevance of avidity testing of VCA IgG in EBV diagnostics – 8-th South East European Conference on Chemotherapy, Infection and Cancer. *Durres, Albania, 2017, October 12-15.*

### **8. УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ**

1. „Сероепидемиологични и лабораторно диагностични проучвания върху разпространението и клиничната значимост на Epstein-Barr вирусната инфекция“.

Изказвам личната си и най-искрена благодарност на:

Научния ми ръководител доц. д-р Лилия Иванова за всеотдайността и оказаната подкрепа и ценните съвети по време на писане на докторантурата и при изработване на пробите.

На проф.д-р Димитричка Близнакова-директор на МК-Варна за оказаното съдействие при събиране на пробите и най-вече за силната вяра и позитивизма, с които ме зареждаше.

На клиниката по хематология и клиниката по Детска онкология към УМБАЛ“Св. Марина“ и по-конкретно на доц.д-р Лиана Герчева, доц. д-р Валерия Калева и д-р Стайков, за съдействието при изследване на имunosупресирани пациенти.

На Инфекциозна клиника и на доц. д-р Маргарита Господинова, за помощта при събиране на проби на пациенти с инфекциозна мононуклеоза.

На д-р Живка Стойкова и екипа на вирусологична лаборатория при УМБАЛ“Св. Марина“ за съдействието при изработване на пробите.

На доц. Татина Тодорова за съдействие при статистическата обработка.

На колегите ми от УС“Медицински лаборант“ и от катедра Микробиология и вирусология, които ме насърчаваха и ми вдъхваха увереност.

Специални благодарности на доц.д-р Цветков и на д-р Христов от клиниката по хематология при УМБАЛ „Г.Странски“ –Плевен, които ми помогнаха за събиране на проби на лица с Болест на Ходжкин.

Специални благодарности и на фирма „Елта-90“ и инж. Свилен Първанов за коректните взаимоотношения и подкрепата.