

Strategimøte 1. november 2012

Laboratoriediagnostikk ved Epstein-Barr-virusinfeksjon

Redaktører:

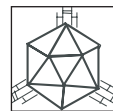
Gro Njølstad

Helvi Holm Samdal

Anita Kanestrøm

Andreas Christensen

Susanne Gjeruldsen Dudman



STRATEGIMØTE

LABORATORIEDIAGNOSTIKK VED EPSTEIN-BARR-VIRUSINFEKSJON

1. NOVEMBER 2012

PROGRAM

OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER

ABSTRAKTER

Redaktører:

Gro Njølstad, Helvi Holm Samdal, Anita Kanestrøm, Andreas Christensen og
Susanne Gjeruldsen Dudman

Referansegruppen for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi

ISBN trykt utgave: 978-82-8082-579-7
ISBN elektronisk utgave: 978-82-8082-580-3

Innholdsfortegnelse

Forord	5
Program	7
Sammendrag og anbefalinger	11
Abstrakter	17
Epstein-Barr-virusets biologi	19
EBV-serologi.....	25
EBV-serologi: Undersøkellesstrategi – EBNA-IgG	31
EBV-serologi: Undersøkellesstrategi – VCA-IgG + VCA-IgM.....	33
Erfaringer med EBV-immunblot ved Sykehuset i Vestfold.....	35
Diagnostikk av EBV-infeksjoner hos pasienter med immunsvikt	39
EBV-PCR	43
Diagnostikk av EBV-infeksjon ved Avdeling for patologi.....	45
EBV i kombination med HIV - vad blir det?	47
EBV-infeksjon: Uvanlige kliniske manifestasjoner og komplikasjoner	51
Deltakere på Strategimøte 1.11.2012	64

Forord

I regi av «Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi» ble det holdt strategimøte om laboratoriediagnostikk ved Epstein-Barr-virusinfeksjoner den 1. november 2012 ved Gjestehuset, Lovisenberg sykehus i Oslo.

Det første strategimøtet om Epstein-Barr-virus (EBV) ble holdt i 2000. Årets rapport er en videreføring og oppdatering av laboratoriediagnostikken og må sees i sammenheng med rapporten fra strategimøtet i 2000. Enkelte tema som ble omtalt i forrige rapport er ikke gjentatt i denne, slik at disse kan være nyttig lesning.

Bakgrunnen for at et nytt strategimøte i 2012 ble holdt var at enkelte analysemetoder er forlatt i praktisk bruk og at det i økende grad har blitt behov for genteknologiske undersøkelser, samt at erfaringen med bruk av disse er større.

Programmet er satt sammen av en programkomite bestående av Andreas Christensen, Anita Kanestrøm, Helvi Holm Samdal og Gro Njølstad (leder).

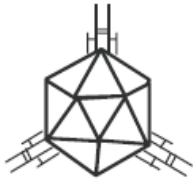
Møteledere var Helvi Holm Samdal (møteleder del I) og Susanne Gjeruldsen Dudman (møteleder del II).

Programkomiteens medlemmer og møtelederne er også redaktører av rapporten.

Rapporten inneholder oppsummering og anbefalinger slik det kom fram på møtet samt sammendrag av foredragene (manuskriptene) som er gjengitt i sin helhet.

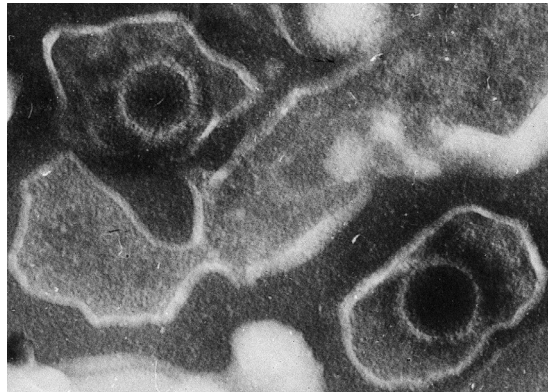
Bergen, mai 2013

Gro Njølstad, Helvi Holm Samdal, Anita Kanestrøm, Andreas Christensen og
Susanne Gjeruldsen Dudman



”Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi”
inviterer landets mikrobiologiske laboratorier til **strategimøte** om

Laboratoriediagnostikk ved Epstein-Barr-virusinfeksjoner



Møtedato: 01.11.2012

Møtested: Gjestehuset, Lovisenberg sykehus, Oslo

Møteledere: Helvi Holm Samdal og
Susanne Gjeruldsen Dudman

Program

Tidspunkt	Tid	Tittel	Foredragsholder
0945 -1000	15 min	Frukt og kaffe	
1000 -1005	5 min	Velkommen Innledning ved leder for referansegruppen/ møteleder	Helvi Holm Samdal
1005 - 1030	20 + 5 min	Epstein-Barr-virusets biologi	Andreas Christensen
1030 -1055	20+5 min	Serologisk diagnostikk	Marianne Thulin Wilhelmsen
1055 -1105	10 min	Undersøkellesstrategi: EBNA-IgG	Sølvi Noraas
1105 -1115	10 min	Undersøkellesstrategi:VCA-IgG/IgM	Andreas Christensen
1115 - 1125	10 min	Kaffepause	
1125 -1135	10min	EBV-immunblot	Andreas Emmert
1135 - 1225	50min	Diskusjon/oppsummering/ anbefalinger	v/møteleder
1225 - 1325	60 min	Lunsj	
1325 - 1330	5 min	Innledning ved møteleder	Susanne Gjeruldsen Dudman
1330 - 1355	20 + 5min	Diagnostikk av EBV-infeksjon hos pasienter med immunsvikt	Ellen Holter
1355 -1420	20 +5 min	EBV-PCR	Svein Arne Nordbø
1420 -1435	15 min	Diagnostikk av EBV-infeksjon ved Avdeling for patologi, OUS	Signe Spetalen
1435 -1445	10 min	Kaffepause	
1445 - 1500	15 min	EBV i kombination med HIV- vad blir det?	Birgitta Åsjø
1500 -1520	20 min	EBV-infeksjon, uvanlige tilstander	Anne Ma Dyrhol Riise
1520 -1600	40 min	Diskusjon/oppsummering/ anbefalinger	v/møteleder

SAMMENDRAG

OG

ANBEFALINGER

Sammendrag og anbefalinger

EBV-infeksjon diagnostiseres i Norge ved antistoffanalyser (serologi) og genteknologiske metoder (PCR).

Bekreftende testing med immunblot brukes foreløpig forsøksvis av ett laboratorium.

Aviditetstesting er en del av supplerende EBV-diagnostikk i noen europeiske land, men brukes ikke i Norge i dag.

Siden forrige strategimøte har PCR-metodikk utviklet seg betydelig og har nå en bred plass i diagnostikken av EBV-infeksjoner.

EBV-serologi

Serologi er anbefalt metode for diagnostikk av EBV-infeksjoner hos immunfriske. Indikasjon for undersøkelsen er i all hovedsak mistanke om aktuell mononukleose.

Heterofile antistoffer dannes i løpet av 1-3 uker etter symptomstart. De kan påvises hos opptil 85-90% av ungdom og voksne med primær EBV-infeksjon, men sjeldnere hos små barn; 50% i alderen 2-5 år. Heterofile antistoffer kan være påvisbare i inntil 6-12 måneder.

Hos primærlegen vil påvisning av heterofile antistoffer ved hurtigtest være tilstrekkelig for å konkludere med aktuell infeksjon såfremt det kliniske bildet passer.

Serologisk EBV-diagnostikk på laboratoriet baseres på påvisning av spesifikke IgM- og IgG-antistoffer mot viralt capsid antigen (VCA) og IgG-antistoffer mot Epstein-Barr nukleært antigen (EBNA). Testing for IgA-antistoffer benyttes ikke. Tester for påvisning av antistoff mot early antigen (EA) er forlatt på grunn av lav sensitivitet og spesifisitet.

Test-strategier

For en pasient med mistenkt mononukleose kan både fravær av EBNA-IgG eller tilstedeværelse av VCA-IgM benyttes som markører på aktuell EBV-infeksjon. Dette gir grunnlag for to ulike teststrategier ved spørsmål om primær EBV-infeksjon:

Primærttesting med EBNA-IgG

EBNA-IgG kan vanligvis påvises etter 4-6 uker, og en positiv test vil dermed tyde på at pasienten har vært smittet før dette tidsrommet. Dersom pasientens symptomer oppstod for kortere tid siden, vil videre undersøkelser derfor være unødvendig, og man kan konkludere med tidligere gjennomgått infeksjon. Ved negativt resultat må supplerende testing for VCA-IgM og VCA-IgG foretas.

Feilkilder: Ved tidlig omslag for EBNA-IgG, ned til to uker etter symptomdebut er beskrevet, kan tolkningen «tidligere gjennomgått infeksjon» bli feil. Svært sen serokonversjon forekommer også, inntil 8 måneder er beskrevet. Dette vil kunne føre til unødvendig testing med VCA-IgM og VCA-IgG.

Primærttesting med VCA-IgM og VCA-IgG

VCA-IgM-responsen kommer vanligvis samtidig med symptomstart og vedvarer 2-3 måneder. Denne strategien vil derfor fange opp flere tilfeller av mononukleose noen uker ut i forløpet enn ovennevnte strategi. VCA-IgG-responsen kommer oftest etter 2-4 uker og vedvarer livet ut.

Feilkilder: I enkelte tilfeller er IgM-responsen sen, slik at IgG påvises først. Dette kan føre til at man feilaktig konkluderer med tidligere gjennomgått infeksjon. Problemet kan begrenses ved bruk av sikkerhetsmarginer som beskrevet i abstrakt. Uspesifikke IgM-resultater er en

annen utfordring med denne tilnærmingen, som det er med enhver IgM-test. Et positivt IgM-resultat uten ledsagende IgG-respons må derfor tolkes med forsiktighet.

Hvilken teststrategi bør velges?

Health Protection Agency i England konkluderer med at primærttesting med EBNA-ELISA og VCA-ELISA er likeverdige metoder. Sammenlignende studier har vist at disse to strategiene hver for seg gir tilsvarende verdier for sensitivitet og spesifisitet.

To av laboratoriene i Norge, som har valgt henholdsvis EBNA-ELISA og VCA-ELISA som primærttesting, la fram sine erfaringer til sammenlikning:

Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Sørlandet sykehus i Kristiansand har i mange år foretatt screening for EBV ved å undersøke for EBNA-IgG. Deres EBV-diagnostikk gjøres i hovedsak på immunfriske pasienter med spørsmål om aktuell sykdom. Negative, gråsone og svakt positive prøver blir rutinemessig undersøkt for VCA-IgM og VCA-IgG. I noen tilfeller vil også positive prøver bli supplert med VCA-IgM og VCA-IgG dersom kliniske opplysninger taler for dette. Med en slik tilnærming reduseres antall tester med nær 50 % når man sammenligner med å sette opp de tre parameterne samtidig.

Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St Olavs hospital i Trondheim, tester primært for VCA-IgM og VCA-IgG for raskere å kunne konkludere. Vurderingen av resultatene baseres på analyseresultatets verdi i forhold til cut-off. Det er lagt inn egendefinerte sikkerhetsmarginer. Ved svakt positive resultater legges det stor vekt på klinikk og supplerende analyser før konklusjon.

Strategimøtet diskuterte fordeler og ulemper ved de to teststrategiene inkludert økonomi, ressursbruk og svartid. Konklusjonen ble at strategiene er likeverdige alternativer. Hvert laboratorium må gjøre sin egen vurdering basert på kunnskap om egne testers ytelse. Mange laboratorier i Norge undersøker fortsatt for alle tre parametere primært. Hvorvidt den ekstra kostnaden ved en slik strategi kan veies opp av bedre ytelse, må vurderes av det enkelte laboratorium. Dette vil være avhengig av de enkelte testenes sensitivitet og spesifisitet i tillegg til instrumentering og logistiske utfordringer ved laboratoriet.

Aktuelle kommentarer ved ulike resultatkombinasjoner:

- VCA-IgM og VCA-IgG positiv, EBNA-IgG negativ: «Aktuell infeksjon sannsynlig.»
- VCA-IgM negativ, VCA-IgG og EBNA-IgG positiv: «Tidligere gjennomgått infeksjon.»

Test for heterofile antistoffer vil være et verdifullt supplement dersom man får resultatkombinasjoner som avviker fra de ovennevnte, for eksempel ved påvisning av VCA-IgM alene.

For omtale av andre kombinasjoner av testresultater, se tabell.

EBV-infeksjon kan føre til positiv CMV-IgM på grunn av polyklonal stimulering av B-celler, og CMV-antistoffer kan kryss reagere i IgM-tester for EBV. Avklaring med ny prøve og/eller PCR anbefales.

Ved reaktivitet for både EBV-IgM og CMV-IgM kan også CMV-IgG-nivået vektlegges dersom kvantitativ eller semikvantitativ metode er i bruk ved laboratoriet. Ved en primær CMV-infeksjon vil IgG-verdien vanligvis være lav pga sen serokonversjon. Dersom IgG-verdien er høy, er en primær CMV-infeksjon mindre sannsynlig hos immunkompetente. Det kan være nyttig å sammenligne med gamle prøver i arkivet.

Forslag til tolkning av antistoffmønstre

Tester fra ulike produsenter har ulik sensitivitet og spesifisitet. Laboratoriernes egne erfaringer må derfor også vektlegges.

VCA-IgG	VCA-IgM	EBNA-IgG	Heterofile antistoffer	Tolkning og eventuelle tiltak
-	-	-	-	Aktuell infeksjon ikke påvist. Mottagelig for EBV-infeksjon. Eventuelt ny prøve hvis tidlig sykdomsfase
+	-	+	-	Tidligere gjennomgått infeksjon
+	+	-	+ eller -	Aktuell infeksjon sannsynlig
-	+	-	+	Aktuell infeksjon i tidlig fase sannsynlig dersom klinisk bilde passer. Ny prøve ved tvil, evt. PCR i blod/(hals)
-	+	-	-	Inkonklusivt serologisk mønster, må relateres til alder og klinikk. Aktuell infeksjon i tidlig fase? Uspesifikk reaktivitet/kryssreaksjon/polyklonal stimulering? Eventuelt ny prøve
+*	-	-	+	Aktuell infeksjon mulig dersom klinisk bilde passer. Tidlig sykdomsfase eller manglende VCA IgM-produksjon? Eventuelt ny prøve med tanke på tilkomst av IgM
+*	-	-	-	Inkonklusivt serologisk mønster. Tidligere gjennomgått infeksjon hvor EBNA-antistoffer er under deteksjonsnivå? Aktuell infeksjon med manglende VCA-IgM-produksjon? Eventuelt ny prøve dersom tidlig sykdomsfase med tanke på tilkomst av IgM
+	+	+	-	Inkonklusivt serologisk mønster, må relateres til alder og klinikk. Tidligere gjennomgått infeksjon?
-	-	+	-	Ikke sannsynlig serologisk mønster. Kan skyldes falskt positiv EBNA-IgG test

* IgG-nivået bør tas med i betraktning

Immunblot

Immunblot-undersøkelse er ikke validert for bruk i rutinen i Norge, og det er begrenset praktisk erfaring. Flere studier trenges for å vurdere nytten av en slik undersøkelse.

Også for EBV-blot er det muligheter for kryssreaksjoner med CMV.

Diagnostikk av EBV-infeksjoner hos pasienter med immunsvikt

EBV-assosierte tilstander etter transplantasjon, ved HIV eller annen immunsvikt:

- Leiomyom/leiomyosarkom i glatt muskulatur
- Ved HIV-infeksjon: Oral hårcelleleukoplaki (vanligvis benign)
- B-celle lymfoproliferativ sykdom, deriblant post-transplantasjon lymfoproliferativ tilstand (disorder) – PTLD
- EBV-assosiert kolitt med bilde som inflammatorisk tarmsykdom
- EBV-lesjoner i GI-traktus kan gi blødninger som kan være livstruende
- Hodgkins og non-Hodgkins lymfom

Pretransplantasjonutredning: Immunstatusundersøkelse (EBV-IgG) bør gjøres hos organdonor og -mottaker. Antistoffpåvisning skiller ikke mellom egenproduserte, maternelle eller passivt tilførte antistoffer.

EBV-diagnostikk av pasienter med immunsvikt:

EBV-PCR er anbefalt metode for både overvåking og sykdomsutredning. Kvantitativ PCR benyttes i blod (EDTA-fullblod eller plasma) og spinalvæske. For tiden brukes EDTA-fullblod ved Rikshospitalet. Kvalitativ PCR benyttes på biopsier. Antistoffpåvisning kan være et supplement til PCR ved spørsmål om primærinfeksjon, men det er viktig å være oppmerksom på muligheten for forsinket humoral immunrespons og serokonversjon ved immunsvikt. Serologi er uaktuelt ved spørsmål om reaktivering.

Supplement til EBV-PCR:

- In situ hybridisering for påvisning av EBV-RNA i biopsier
- Immunhistokjemisk påvisning av B-cellemarkører (CD20, CD79A) i biopsier
- EBV-spesifikke CD8+ cytotoxiske T-celler
- Klinisk overvåking av adenotonsillær hypertrofi som tidlig tegn på primær EBV-infeksjon. Korrelerer med påvisning av EBV-RNA (EBER) i tonsillevevet.

Det finnes ingen nasjonale eller internasjonale retningslinjer for hyppighet av prøvetaking. Dette må følgelig vurderes individuelt avhengig av grad av risiko for utvikling av PTLD.

Tolkning av EBV-PCR-funn: Lav viruskonsentrasjon (lave kopiantall/høy CT-verdi) i spinalvæske og biopsier bør tolkes med forsiktighet.

Selv om det ofte er korrelasjon mellom viruskonsentrasjon og symptomer, sees gjerne positiv EBV-PCR i blod uten klinisk betydning ved starten av immunsuppressiv behandling.

Omtrent tre uker før PTLD-utvikling ser man ofte en markant økning i virusmengde (kopiantall); men dette kan også sees uten PTLD-utvikling. PTLD kan også forekomme uten at EBV er involvert.

Oppsummering: EBV-immunstatusundersøkelse bør gjøres hos både organdonor og -mottaker. EBV-PCR i EDTA-blod benyttes til regelmessig overvåking og ved symptomer. EBV-PCR benyttes på biopsier eller spinalvæske ved aktuelle symptomer. EBV-antistoffundersøkelse kan være et supplement ved primærinfeksjon, men er uten verdi ved reaktivering.

EBV – PCR

Aktuelle prøvematerialer til PCR er først og fremst EDTA-blod, spinalvæske, biopsi eller halsprøve.

Viktigste indikasjon for EBV-PCR er monitorering av viremi hos immunsupprimerte pasienter. Testen kan også være nyttig ved inkonklusiv serologi og ved spørsmål om viral encefalitt. Indikasjoner hos immunsupprimerte pasienter er omtalt ovenfor. Funn i halsprøve kan være vanskelig å tolke, og EBV-PCR på halsprøve er derfor ikke anbefalt som primærundersøkelse ved mononukleose.

Ved CNS-affeksjon er kvantitativ PCR i spinalvæske eller blod å foretrekke. Det er sammenheng mellom virusmengde og sykdommens alvorlighetsgrad. Små mengder EBV-DNA i spinalvæske bør tolkes med forsiktighet. Dette kan representere reaktivert virus i forbindelse med annen sykdom i sentralnervesystemet. Det er ikke holdepunkter for at slik reaktivering har klinisk betydning.

Diagnostikk av EBV-infeksjon ved Avdeling for patologi, OUS

Problemstillinger:

- Reaktive forandringer i bl.a. lymfeknute
- Vevsprøver fra pasienter med immunsvikt
- Tumordiagnostikk (lymfom, nasofaryngealt karsinom)

Påvisning i biopsier baseres først og fremst på immunhistokjemi, in situ hybridisering eller PCR (mikrobiologisk avdeling).

Andre metoder (ikke rutinediagnostikk) er klonalitetsundersøkelse av EBV-genomet, flowcytometri eller western blot.

EBER in situ-hybridisering og immunhistokjemi har begge den fordel at de gir morfologisk informasjon. Man kan identifisere de EBV-infiserte cellene og se hvor stor andel av dem som er infisert. EBER in situ-hybridisering er mest sensitiv og spesifikk, men kan være falskt negativ dersom RNA er degradert. Immunhistokjemi vil da være et alternativ.

EBV-PCR er et meget sensitivt og spesifikt alternativ ved dårlig bevart RNA i biopsien, men den gir ikke morfologisk informasjon. Det vil derfor være viktig å være oppmerksom på hvor representativ prøven er.

EBV i kombinasjon med HIV

HIV-infeksjon fører vanligvis til økt antall EBV-positive B-celler og betydelig økt risiko for utvikling av non-Hodgkins lymfom.

HAART reduserer, men eliminerer ikke risikoen for non-Hodgkins lymfom, og behandlingen har liten effekt på EBV-konsentrasjonen i blodet.

EBV-DNA kvantitering har liten eller ingen nytte for risikobedømming av pasienter på HAART.

EBV-serologi har ingen plass i oppfølgingen av HIV-positive pasienter.

EBV-infeksjon, uvanlige tilstander

Flere organsystem kan affiseres ved akutt EBV-infeksjon og i ca. 5 % av tilfellene forekommer komplikasjoner.

Kronisk aktiv EBV-infeksjon preges av persisterende symptomer på mononukleose med feber, lymfeglandelsvulst, hepatosplenomegali, forhøyede levertransaminaser og cytopenier. Det sees høye nivåer av EBV-DNA i blod.

Flere maligne sykdommer er assosiert med EBV-infeksjon, bl.a. Burkitts lymfom, Hodgkins lymfom, non-Hodgkins lymfom, leiomyom, leiomyosarkom, nasofaryngealt karsinom og T-celle-lymfom.

EBV-infeksjon kan forløpe alvorlig og fatalt ved sjeldne genetiske tilstander.

ABSTRAKTER

Epstein-Barr-virusets biologi

Andreas Christensen, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital

Jeg vil her gi en kort gjennomgang av Epstein-Barr-virusets biologi med spesielt fokus på de forhold som har betydning for praktisk diagnostikk i dag. Det vil være naturlig å sette viruset i perspektiv ved først å se på fellestrekk for hele herpesvirusfamilien.

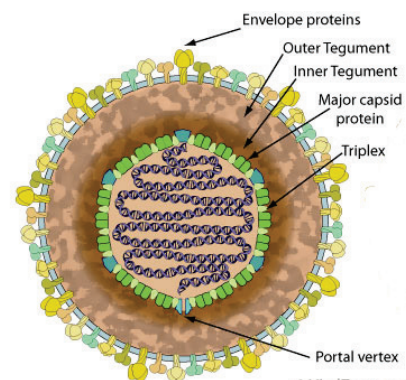
Herpesvirus

Herpesvirus «baserer» sin eksistens på latens i langlivede celler. Regelmessige reaktiveringer fra et slikt reservoar sikrer transmisjon selv ved lavgradig reproduksjon i små pasientpopulasjoner.

Dette står i skarp kontrast til luftveisvirus som f.eks. influensavirus. Disse virusene «baserer seg på» høy virusproduksjon og spredning av store mengder virus fra vert til vert i løpet av kort tid. Dette kan føre til at viruset «sveiper over» en pasientpopulasjon. Herpesvirus lever mer «stillferdig» i så henseende. De er dermed i større grad avhengige av at vertene lever lenge.

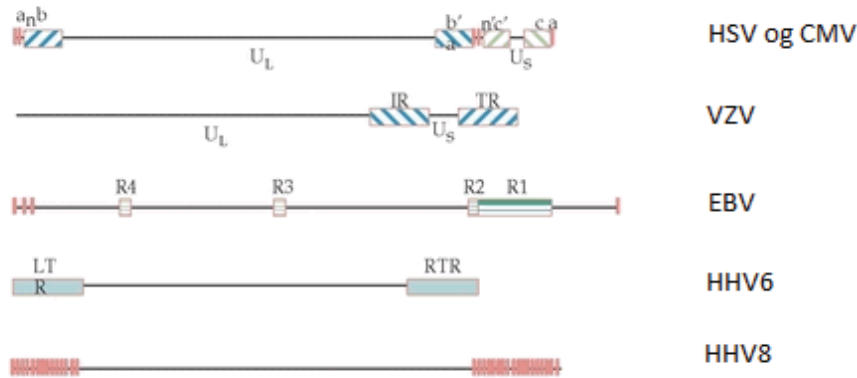
Karakteristika for herpesvirusgruppen:

- Hvert enkelt herpesvirus har et smalt vertsspektrum (1)
- Infiserer kun virveldyr (med ett kjent unntak: Østers)
- Klassifikasjon:
 - De virus som infiserer pattedyr, fugler og krypdyr inndeles i tre subfamilier: Alfa-, beta- og gammaherpesvirinae
 - 13 genera: Epstein-Barr-virus (EBV) tilhører genus lymphocryptovirus som hovedsakelig infiserer aper og mennesker
- Herpesvirus viser stor grad av koevolusjon med sine verter. Dette tyder på at de er genetisk stabile, og at de humane virusene har forandret seg lite siden de første menneskene. («EBV følger out of Africa-hypotesen») (2).
- Virusenes livssyklus er nøye avstemt med vertscellens. De har mange gener for kontroll av både virusets og vertscellens aktivitet.
- Det typiske er at herpesvirus infiserer to ulike celletyper: Én permissiv (gir lytisk infeksjon) og én nonpermissiv/semipermissiv (gir latent infeksjon).
 - Herpes simplex-virus (HSV): Henholdsvis epitel- og ganglionceller
 - EBV: Epitel- og hukommelses-B-lymfocytter (Hukommelses-B-lymfocytter og ganglionceller er celler med lang levetid – ofte hele vertens liv)
- Tidvis reaktivering er nødvendig for transmisjon. Slik kan viruset bestå i små vertsdyrpopulasjoner selv om smittsomheten er moderat. Dette har vært en suksessoppskrift. Herpesvirus finnes i alle befolkninger over hele verden.
- Virusstruktur:
 - Membrankledd
 - 100-300 nm diameter
 - Tegument (proteinlag mellom membran og kapsid)
 - Kapsid 100 nm



© ViralZone 2012
Swiss Institute of Bioinformatics

- Genomstruktur:



Basert på Field's Virology, Fifth Edition, Copyright © 2007

- 120-240 kbp, lineære genomer (sirkulære intracellulært)
- Koder for 100-200 gener
- Terminal repeats
- Internal repeats
- Unike long (UL) – for EBV inndelt i U2-5
- Unike short (US) – for EBV også kalt U1
- Repeats fremmer rekombinasjon under replikasjonsprosessen, noe som fremmer variasjon og gir grunnlag for evolusjon.

Lytisk infeksjon

Transkripsjonens faser:

- Tegumentproteiner aktiverer «immediate early» gener og hemmer transkripsjonen av vertens gener
- «Immediate early» (regulatoriske proteiner)
- «Early» (replikasjonsenzymmer) – for EBV: EA (early antigen) er et proteinekstrakt fra denne transkripsjonsfasen som tidligere var hyppig benyttet i serologiske tester
- «Late» (strukturelle proteiner) – for EBV: bl.a. VCA – kapsidprotein som benyttes i serologiske tester

Lytisk infeksjon fører til celledød.

Latent infeksjon:

Mye av kunnskapen vi har om latens har vi fra forskning på HSV og EBV.

Latens oppstår i lite permissive celler (nerveceller, B-lymfocytter m.fl.) som kommer i kontakt med epitelceller der lytisk infeksjon skjer.

Ca.10 kopier episomale sirkulære genomer finnes per latent infiserte celle (gjelder HSV) (3). Kun få gener uttrykkes (kan sammenlignes med en dvaletilstand): Disse genene er involvert i regulering av vertscellens genuttrykk og interferer bl.a. med apoptose-mekanismer for slik å forlenge cellenes levetid (EBV) (4).

Reaktivering skjer med ulikt mønster fra virustype til virustype. Reaktivering fører til begrenset replikasjon som vil gjøre det mulig å spre virus til nærliggende epitelceller (som man f.eks. ser ved HSV-1-lesjoner rundt munnen). Vertscellen dør vanligvis ved reaktivering.

Epstein-Barr-virus

Tilhører subfamilien gammaherpesvirinae og slekten (genus) lymphocryptovirus. Det finnes to serotyper (1 og 2). Type 2 forekommer først og fremst i Afrika. Koinfeksjoner med begge typer forekommer, og i Vesten er dette assosiert med immunsuppresjon (5). Infeksjon med ny type er antakelig asymptomatisk. Det debatteres hvorvidt man kan re-infiseres suksessivt med flere stammer (asymptomatisk), eller om man er kryssimmun mot alle stammer innen samme type (6).

Genom (se figur over):

Inneholder mange repeats. Diagnostisk poeng: Den mest brukte PCR har en repetert del av EBNA-1-genet (BamHI) som målområde (7-11 kopier). Når det er mange målområder i samme genom øker analytisk sensitivitet, men ettersom antall repetisjoner per genom ikke er konstant vil en slik PCR være uegnet til kvantitering.

Biologi

Kun B-celler kan infiseres av fritt virus.

Reseptor: CD21 (B-cellemarkør, komplementreseptor)

Reseptorligand: gp350 (viralt membranprotein)

Dette er lite permissive celler og en full lytisk livssyklus skjer ikke. B-cellene stimuleres derimot til celledeling, og en kraftig T-celle-respons settes i gang. Dette fører igjen til etablering av latent infeksjon i B-cellene (7).

Infeksjon av epitelcellene skjer deretter ved at virus overføres fra B-cellene, og det er her man får den akutte primærinfeksjonen med full lytisk livssyklus (8).

Siden kan virus skilles ut fra epitelceller med ulike mellomrom etter overføring fra latente infiserte hukommelses-B-celler i nærheten (f.eks. i tonsillene). Virusutskillelse skjer i lang tid etter en primærinfeksjon (mononukleose), og kan siden skje ved reaktiveringer (9, 10).

Latent infeksjon oppstår i kun en liten andel av B-cellene. Latent infeksjon graderes på følgende måte:

Latens 0 – nesten fullstendig inaktivt genom (kun enkelte mikro-RNA (EBER) dannes)

Latens I – svært begrenset transkripsjon (kun EBNA-1)

Latens II – begrenset transkripsjon (EBNA-1, LMP1, LMP2A, LMP2B)

Latens III – noe mer uttalt transkripsjon (EBNA-1, -2 og -3, LP, LMP1, LMP2A og LMP2B)

Latensgenene nevnt i listen over er unike for EBV.

Graderingen av latens inngår i et nøye avstemt samspill mellom virus og vertscelle. Viruset «søker» balanse mellom virustransmisjon på den ene siden, og på den andre siden det å unngå T-celleresponser.

Ved latens 0-II skjer ingen celledeling, og cytotoksiske T-celleresponser utløses ikke. Dette er «gå i dekning»-strategier. Ved latens III skjer en viss celleproliferasjon, virus kan da overføres til andre celler og samtidig avdekkes antigener for det cellemedierte immunforsvar. Malign transformasjon av B-celler kan skje på dette stadiet (11).

Latens innledes alltid med en periode med Latens III-mønster, for slik å etablere seg i et tilstrekkelig antall celler. Latens II og I inntreder deretter.

EBNA-1 er et sentralt protein i denne sammenheng. Det regulerer EBV-genuttrykk og bidrar til segregering av episomalt DNA under celledeling for å maksimere spredningen av viralt genom. Proteinet dannes i små mengder og er lite immunogent. Immunresponsen mot EBNA-antigenene kommer derfor sent.

Latens III samt lytisk infeksjon kan siden vekkes til live igjen i ulike sammenhenger. B-celler kan for eksempel bli permissive og åsted for full lytisk livssyklus når de differensierer til plasmaceller. Slik kan EBV skilles ut i bl.a. halssekret når B-celleresponser mot andre agens utløses (12). Dette er påvist også i bronkialskyllvæske og vaginalsekret (13, 14), og kan antakelig skje i mange flere typer prøvemateriale, f.eks. spinalvæske. Viruskonsentrasjonen er vanligvis betydelig lavere ved reaktivering. Dette er kunnskap man har basert på kvantitative analyser utført på blod. Pasienter med mononukleose har en betydelig viremi som varer 1-3 uker, mens viremien ved reaktivering er mindre (varigheten varierer) (15). Det er vår erfaring at reaktiveringer gir lavere viruskonsentrasjoner enn primærinfeksjoner også i halsprøver (vurdert semikvantitativt).

Primær infeksjon av B-cellen fremmer celledeling, differensiering til hukommelsescelle og innleder prosessen som fører til somatiske mutasjoner av immunoglobulin-genene og seleksjon av immunoglobuliner (klonal ekspansjon). Slik fremmes dannelsen av antistoffer mot andre antigener enn EBVs. Dessuten, ved infeksjon av en ferdig primet hukommelses-B-celle aktiveres produksjonen av dennes høy-avide antistoffer. Alt i alt fremmer dette dannelse av IgM-, IgG- og IgA-antistoffer av mange spesifisiteter, noe som kan føre til diagnostiske problemer ved bruk av andre serologiske tester. Spesifisitetene avgjøres av antigener pasienten har møtt nylig eller tidligere i livet. Dannelsen av heterofile antistoffer inngår i dette bildet (16). Heterofile antistoffer er IgM-antistoffer som reagerer med antigener på saue-, heste- og okseblodlegemer. Bakgrunnen for at antistoffer med akkurat disse spesifisitetene dannes er ikke kjent.

Aktiverte EBV-spesifikke CD8-celler i blodet øker dramatisk i antall ved mononukleose (opptil 20 ganger). Det er disse som utgjør de typiske mononukleose-cellene som brukes diagnostisk. Ved asymptomatiske EBV-infeksjoner ser man ikke dette bildet, noe som er forenlig med svakere systemisk immunaktivering. Dette skjer hyppigst hos barn. CD8-cellene hemmer spredningen av virus effektivt og bringer infeksjonen under kontroll. Slik presses virus mot Latens 1 og 0-strategier.

Referanser:

1. Pellett PE, Roizman B. Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PH, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. Field's Virology. 5th edition ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2479-99.
2. Ehlers B, Spiess K, Leendertz F, Peeters M, Boesch C, Gatherer D, et al. Lymphocryptovirus phylogeny and the origins of Epstein-Barr virus. J Gen Virol. 2010;91(Pt 3):630-42. Epub 2009/11/20.
3. Wang K, Lau TY, Morales M, Mont EK, Straus SE. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus DNA in human trigeminal Ganglia at the single-cell level. J Virol. 2005;79(22):14079-87. Epub 2005/10/29.

4. Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *The EMBO journal*. 1998;17(6):1700-9. Epub 1998/05/02.
5. Chang CM, Yu KJ, Mbulaiteye SM, Hildesheim A, Bhatia K. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus research*. 2009;143(2):209-21. Epub 2009/07/15.
6. Rickinson AB, Kieff ED. Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PH, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Field's Virology*. 5th edition ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2655-700.
7. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2001;1(1):75-82. Epub 2002/03/22.
8. Herrmann K, Frangou P, Middeldorp J, Niedobitek G. Epstein-Barr virus replication in tongue epithelial cells. *J Gen Virol*. 2002;83(Pt 12):2995-8. Epub 2002/12/06.
9. Balfour HH, Jr., Holman CJ, Hokanson KM, Lelonek MM, Giesbrecht JE, White DR, et al. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 2005;192(9):1505-12. Epub 2005/10/06.
10. Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1571-80. Epub 2003/05/02.
11. Kieff ED, Rickinson AB. Epstein-Barr Virus and Its Replication. In: Knipe DM, Howley PH, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al., editors. *Field's Virology*. 5th edition ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2603-54.
12. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*. 1995;85(3):744-50. Epub 1995/02/01.
13. Egan JJ, Stewart JP, Hasleton PS, Arrand JR, Carroll KB, Woodcock AA. Epstein-Barr virus replication within pulmonary epithelial cells in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1995;50(12):1234-9. Epub 1995/12/01.
14. Enbom M, Strand A, Falk KI, Linde A. Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sexually transmitted diseases*. 2001;28(5):300-6. Epub 2001/05/17.
15. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5419-28. Epub 2003/12/10.
16. Garzelli C, Taub FE, Scharff JE, Prabhakar BS, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. *J Virol*. 1984;52(2):722-5. Epub 1984/11/01.

EBV-serologi

Marianne Thulin Wilhelmsen, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland Universitetssjukehus

Ved serologisk diagnostikk av Epstein-Barr-virusinfeksjoner kan det benyttes metoder for påvisning av heterofile antistoffer og/eller metoder for påvisning av spesifikke EBV-antistoffer. Ved ca 1/3 av norske legekantor utføres det hurtigtest for påvisning av heterofile antistoffer (1996-2000)(1). I tillegg utføres slike hurtigtester også ved andre laboratorier og "bed-side" på sykehus. Mikrobiologiske laboratorier bør derfor tilby påvisning av spesifikke EBV-antistoffer som supplement ved diagnostikk av EBV-infeksjoner, hovedsakelig for tilfeller med atypisk/usikker klinikk eller tilfeller med klinisk mistanke om aktuell EBV-infeksjon, men negativ hurtigtest for heterofile antistoffer.

EBV-serologi er et viktig diagnostisk verktøy ved spørsmål om primær EBV-infeksjon hos immunkompetente. Andre indikasjoner for EBV-serologi kan være behov for avklaring av EBV-status før transplantasjon og immunsuppresjon. Ved oppfølging av immunsupprimerte pasienter, pasienter med EBV-relatert malignitet (nasofaryngealt karsinom og EBV-relatert lymfom) eller X-linked lymfoproliferativt syndrom er monitorering av virusmengde en bedre metode, og serologi er da ikke anbefalt.

Det er per i dag ikke noe sikkert klinisk bilde knyttet til reaktivering av EBV hos immunkompetente, og da det heller ikke er noe entydig serologisk bilde relatert til reaktivering, er dette ikke anbefalt som indikasjon for EBV-serologi.

Tabell 1

OVERSIKT AKTUELLE METODER EBV-SEROLOGI (2)

AKTUELLE METODER	Antall tester tilgjengelig	Fordeler/ulemper
HETEROFILE ANTISTOFFER	Ca 40	Raske og billige. Agglutinasjonstester krever mer erfaring enn immunkromatografiske metoder. Kan være positiv i opptil et år. Ikke spesifikk.
Agglutinasjonstester		
Immunkromatografiske metoder		
SPESIFIKKE ANTISTOFFER		
Immunkromatografiske metoder	Ca 2	Ulike antigener inngår i kit. Rask.
EIA elisa	Ca 15	Ulike antigener og ulike metoder for framstilling av disse. Svartid 2-3 timer.
EIA "dot technique"	1	Kombinert med CMV og Toxoplasma gondii. Svartid 2-3 timer.
EIA CLIA*	Ca 2	Rask (<1 time). "Random access*". Spesifikke instrumenter nødvendig
Flowcytometribasert med mikropartikler	Ca 3	Kombinert med CMV eller heterofile antistoffer. Rask (<1 time). Kan påvise flere spesifikke antistoffer tilsvarende blot.
Immunfluorescens	3	Gullstandard. Høy spesifisitet. Tidkrevende. Subjektiv tolkning. For påvisning av EBNA må det brukes ACIF**. Påviser både EBNA-1 og -2.
Immunblotting	Ca 10	Dyrt. Arbeidskrevende.

*CLIA=chemiluminescens immunoassay

**ACIF=antikomplement immunfluorescens

Immunfluorescens regnes fortsatt som gullstandard for EBV-serologi. Metoden har høy spesifisitet, men er tidkrevende og gir en subjektiv tolkning. De fleste mikrobiologiske rutinelaboratorier benytter per i dag ulike ELISA eller CLIA-metoder for påvisning av spesifikke EBV-antistoffer. Fordeler med CLIA framfor ELISA er kortere svartid og mulighet for ”random access”. Ulike fremstillingsmetoder (nativt rensede antigener eller antigener som er rekombinant eller syntetisk fremstilt) og variasjoner i antigenene som anvendes (det kan anvendes hele eller deler av de ulike antigenkompleksene), kan gi store variasjoner mellom ulike produsenter. Flowcytometrierte metoder med mikropartikler gir mulighet for påvisning av flere antistoffer på kort tid.

Antigener som kan inngå i ulike EIA- metoder

De mest brukte og mest aktuelle antigener som inngår i ulike EIA- metoder er viralt capsid antigen (VCA), Epstein-Barr-virus nuclear antigen 1 (EBNA-1) og early antigen (EA). Se Tabell 2 for eksempler på hvilke antigener som inngår i ulike tester og hvordan de er fremstilt. Variasjoner i EBNA-1 antigenet kan gi ulike resultater i forhold til når antistoff er påvisbart, men produsenter av EIA-kit prøver da å tilpasse cut-off i forhold til gullstandard, dvs at EBNA-1 ideelt sett skal være påvisbart tidligst 4-6 uker etter start av symptomer (3).

I enkelte tester for påvisning av antistoffer mot EBV, inngår antigenet ZEBRA-protein (immediateearly gene BZLF1). Det foreligger begrenset dokumentasjon på klinisk nytte av å påvise antistoffer mot dette proteinet ved spørsmål om primær EBV-infeksjon. Publikasjoner som foreligger konkluderer med at påvisning av antistoffer mot ZEBRA-protein kan være nyttig mtp diagnostikk av aktuell EBV- infeksjon (4, 5).

Tabell 2

EKSEMPLER PÅ ULIKE PRODUSENTER AV EBV EIA-/ CLIA-METODER OG ANTIGEN SOM INNGÅR I METODE

Rensede native antigen = NA, Rekombinant antigen = RA, Syntetisk peptid = SP

	VCA-IgG	VCA-IgM	EBNA-1-IgG	EA-IgG	Zebra peptid+p54EA-IgM
Serion Elisa Classic	NA (hovedsakelig p18 og p23)	NA (hovedsakelig p18)	NA (hovedsakelig p72)	NA (hovedsakelig p54 og p138)	
PanBio	NA (gp125 oppkonsentrert) og SP VCA-p18	NA (gp125 oppkonsentrert)	RA		
Novitec	NA P3HR1 og RA BFRF3	NA gp125	RA		
recomWell Mikrogen	RA		RA		RA
Diagen Vircell	NA	NA	NA		
DiaSorin Liaison	SP, dominerende p18	SP, dominerende p18	SP		
Siemens Immulite 2000	SP/RA?, gp125	SP, p18	RA, p72		

SEROLOGISK TOLKNING

- Heterofile antistoffer:

Heterofile antistoffer dannes i løpet av 1-3 uker etter start av symptomer. Kan påvises hos opp til 85-90% av ungdom og voksne med primær EBV-infeksjon, men sjeldnere hos små barn (50% i alder 2-5 år). (3) Kan være påvisbart i inntil 6-12 måneder. Heterofile antistoffer er ikke spesifikke antistoffer og kan også påvises ved en rekke andre tilstander; autoimmune tilstander, lymfom og andre infeksjoner (HIV, CMV, rubella, Toxoplasma gondii)(2).

- Spesifikke antistoffer:

Pga lang inkubasjonstid, er VCA-IgG og VCA-IgM oftest påvisbare ved symptomdebut. EBNA-antistoffer kan vanligvis påvises fra ca 4 uker til 3 måneder etter start av symptomer. I de fleste tilfeller vil en kunne konkludere med aktuell (/nylig) infeksjon (VCA-IgG og VCA-IgM påvist i fravær av EBNA-IgG), tidligere gjennomgått infeksjon (VCA-IgG og EBNA-IgG påvist i fravær av VCA-IgM) eller fortsatt mottagelig for EBV-infeksjon (ingen antistoffer påvist) på bakgrunn av en akutfaseprøve. Andre tolkningskategorier (nylig/konvalesent, reaktivering) bør unngås pga begrenset klinisk betydning. Serologiske mønstre som ikke passer inn i overnevnte kategorier, bør besvares som usikre/inkonklusive og eventuelt anbefales kontrollprøve med mindre resultatet kan avklares med supplerende testing (f.eks heterofile antistoffer, aviditet, blot, annen serologi).

- VCA-IgG aviditet:

Aviditetstesting kan utføres i kombinasjon med IFA, ELISA og immunblot. Aviditetstesting for VCA-IgG kan benyttes for å bekrefte aktuell infeksjon i tilfeller der rutine EBV-serologi er inkonklusiv (6).

Tabell 3

Tolkning antistoff mønstre etter Hess (3)

VCA-IgG	VCA-IgM	EBNA-1-IgG	(Heterofile antistoffer)	Tolkning
+	+	-	+ eller -	Akutt infeksjon
+	-	+	-	Tidligere gjennomgått infeksjon
-	-	-	-	Ikke aktuell infeksjon (mottagelig for EBV infeksjon)
+	-	-	+ eller -	Inkonklusiv
+	+	+	-	Inkonklusiv
-	+	-	-	Inkonklusiv
-	-	+	-	Ikke sannsynlig serologisk mønster

- **Inkonklusive serologiske mønstre**

1. VCA-IgG+, VCA-IgM- og EBNA-IgG-:

Hos 5-10 % er EBNA-IgG kun tilstede i svært lave titer/ikke påvisbart (høy alder, immunsuppresjon)(2, 3). I tillegg produserer ikke alle VCA-IgM under primær EBV-infeksjon (3), og følgelig kan resultatet av EBV-serologi være helt likt ved aktuell infeksjon og tidligere gjennomgått infeksjon.

2. VCA-IgG+, VCA-IgM+ og EBNA-IgG+:

Påvisning av alle tre parametre kan enten skyldes uspesifikk IgM/kryssreaktivitet (f eks ved andre akutte infeksjoner eller reumatiske tilstander) eller at VCA-IgM vedvarer etter at EBNA-IgG er påvisbart. Positiv EBV-IgM ved andre akutte infeksjoner kan skyldes polyklonal B-celle aktivering, kryssreaktivitet mellom IgM-antistoffer eller uspesifikk reaktivitet (naturlige antistoffer).(7) Ved aktuell primær CMV- infeksjon er dette hyppig forekommende.

3. VCA-IgG-, VCA-IgM+, EBNA-IgG-:

Påvist isolert VCA-IgM, kan skyldes uspesifikk reaktivitet, men kan også forekomme ved aktuell EBV-infeksjon. Hvor hyppig det påvises isolert IgM, vil til en viss grad avhenge av sensitivitet og spesifisitet for de ulike markører som benyttes. VCA-p18 IgG er angitt å ha lav sensitivitet tidlig i sykdomsforløpet, og metoder som kun benytter p18 antigen for påvisning av IgG vil da hyppigere påvise isolert VCA-IgM i en akutfaseprøve. (12).

• **Antistoff mot early antigen (EA)**

EA-antistoffer som markør på akutt EBV-infeksjon er både lite sensitivt og lite spesifikt. Kun 60-80 % av pasienter med en tidlig akutt EBV-infeksjon har påvisbare antistoffer mot EA, og disse antistoffene kan også påvises hos friske blodgiver.(2,3)

Konklusjon:

VCA-IgG, VCA-IgM og EBNA-1-IgG antistoffer er de mest aktuelle markører for diagnostikk av primær EBV-infeksjon. Antistoffer mot EA har dårlig korrelasjon med en aktuell primær EBV-infeksjon og påvisning av antistoffer mot EA gir lite tilleggsinformasjon. Aktuelle tolkningsmønstre er aktuell infeksjon, tidligere gjennomgått infeksjon og mottagelig for EBV infeksjon (/ingen antistoffer påvist).

Referanser:

1. Skurtveit KJ, Bjelkaroy WI, Christensen NG, Thue G, Sandberg S, Hoddevik G. [Quality of rapid tests for determination of infectious mononucleosis]. Tidsskr Nor Laegeforen. 2001 Jun 10;121(15):1793-7.
2. Gärtner BC. Epstein-Barr Virus. In: James Versalovic KCC, Guido Funke, Jamen H. Jorgensen, Marie Louise Landry, David W. Warnock, editor. Manual of Clinical Microbiology. 10 ed. p. 1575-84.
3. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J Clin Microbiol. 2004 Aug;42(8):3381-7.
4. Bravo D, Munoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Tormo N, Navarro D. Evaluation of an immunofiltration assay that detects immunoglobulin M antibodies against the ZEBRA protein for the diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in immunocompetent patients. Clin Vaccine Immunol. 2009 Jun;16(6):885-8.
5. Yamauchi Y, Tachibana Y, Maeda A, Wakiguchi H, Usui M, Kurata T, et al. Evaluation of antibodies to the Epstein-Barr virus immediate early gene product ZEBRA by a new enzyme-linked immunosorbent assay. Intervirology. 1998;41(6):278-84.

6. Vilibic-Cavlek T, Ljubin-Sternak S, Kos L, Mlinaric-Galinovic G. The role of IgG avidity determination in diagnosis of Epstein-Barr virus infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2011 Dec;58(4):351-7.
7. Berth M, Bosmans E. Comparison of three automated immunoassay methods for the determination of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr;17(4):559-63.
8. de Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, Garcia-Bermejo I. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Mar;18(3):444-8.
9. Debyser Z, Reynders M, Goubau P, Desmyter J. Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Clin Diagn Virol*. 1997 May;8(1):71-81.
10. Farber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p23 and p18. *J Med Virol*. 2001 Apr;63(4):271-6.
11. Feng Z, Li Z, Sui B, Xu G, Xia T. Serological diagnosis of infectious mononucleosis by chemiluminescent immunoassay using capsid antigen p18 of Epstein-Barr virus. *Clin Chim Acta*. 2005 Apr;354(1-2):77-82.
12. Gartner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K, et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jan;10(1):78-82.
13. Lupo J, Germe R, Semenova T, Buisson M, Seigneurin JM, Morand P. Performance of two commercially available automated immunoassays for the determination of Epstein-Barr virus serological status. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Jun;19(6):929-34.

EBV-serologi: Undersøkellesstrategi – EBNA-IgG

Sølvi Noraas, overlege, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, SSK
solvi.noraas@sshf.no

Ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved Sørlandet sykehus i Kristiansand har vi i mange år screenet for EBV ved å gjøre undersøkelse for EBNA-IgG (1). Det må bemerkes at EBV-diagnostikk hos oss i hovedsak gjøres på i utgangspunktet immunfriske pasienter med spørsmål om aktuell sykdom. Negative, gråsoner og svakt positive prøver har så automatisk blitt satt opp på VCA-IgM og VCA-IgG. I noen tilfeller vil også positive prøver bli supplert med VCA-IgM og VCA-IgG ut fra kliniske opplysninger. Med dette opplegget sparer vi nesten 50 % av testene i forhold til å sette opp de tre parameterne samtidig. Begrunnelsen for denne strategi finnes i referansene (1 - 3).

1. Oludare et al. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections Clin.microbiol.Rev. 2011.24(1):193-209.
2. Gärtner,B.C Epstein-Barr virus. I: Versalovic J. et al,red. Manual of clinical microbiology, Washington DC, ASM, 2011. s. 1575-1584.
3. EBV strategimøte. Statens Institutt for Folkehelse, 2000.

EBV-serologi: Undersøkellesstrategi – VCA-IgG + VCA-IgM

Andreas Christensen, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital

Serumprøver til Epstein-Barr-virus (EBV) -serologi undersøkes ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital rutinemessig med VCA-IgM- og VCA-IgG-ELISA.

Alle prøver med IgG-verdi over 1,5 ganger cut-off og negativ IgM, besvares direkte med kommentaren ”Tidligere gjennomgått infeksjon”.

Ved IgG-verdier under 1,5 ganger cut-off, og samtidig negativ IgM, følger kommentaren ”Usikker klinisk betydning”. Klinik vurderes, og ny prøve anbefales dersom kortvarig sykehistorie er oppgitt (1-2 uker).

Alle utslag i IgM-testen fører til vurdering av klinik. Svake utslag ($<2 \times$ cut-off) vurderes med forbehold og besvares med kommentaren ”Lavt titer” eller ”Grenseverdi” ($0,9-1,1 \times$ cut-off), og suppleres ved behov med test for heterofile antistoffer.

Ved IgM-utslag på mellom to og tre ganger cut-off gis kommentaren ”Moderat titer”, og vi graderer besvarelsen med kommentarene ”Aktuell infeksjon mulig” og ”Aktuell infeksjon sannsynlig” avhengig av klinik og resultat av test for heterofile antistoffer.

Ved IgM-utslag over tre ganger cut-off gis kommentaren ”Høyt titer”, og prøven besvares med ”Aktuell infeksjon sannsynlig” dersom klinikken passer.

Med denne tilnærmingen har vi lagt inn egendefinerte sikkerhetsmarginer (som beskrevet ovenfor) der vi legger stor vekt på kliniske opplysninger og supplerende tester før vi konkluderer.

Health protection agency i England anbefaler screening med EBNA- eller VCA-ELISA som to likeverdige metoder (1). Vi har valgt sistnevnte for raskere å kunne gi konklusjoner.

EBNA-screening fører til et to-trinn-system dersom innledende EBNA er negativ, og endelig konklusjon vil ofte være minst ett døgn forsinket.

Problemet med sen serokonversjon for IgM, slik at IgG-konversjon kommer først, kan være et argument for bruk av EBNA som førstelinjemetode. Vår algoritme for vurdering av ”titer” (signalstyrke) samt bruk av test for heterofile antistoffer skulle redusere dette problemet. Svake IgG-signaler blir vurdert individuelt, og vi har lav terskel for å anbefale ny prøve dersom test for heterofile antistoffer ikke allerede har gitt en konklusjon. Problemet med uspesifikke IgM-resultater reduseres også med en slik «titer»-basert strategi. I denne sammenhengen mener vi EBNA-IgG gir lite tilleggsinformasjon. Vi bruker denne testen kun dersom vår standardtilnærming ikke gir en sannsynlig konklusjon, og det ønskes sikrere holdepunkter for at pasienten har vært smittet for mindre enn to til tre måneder siden. Dette er det sjelden behov for.

Diagnostiske problemer oppstår også ved samtidig påvisning av IgM mot cytomegalovirus (CMV). EBV-infeksjon kan gi kryssreaksjoner i tester for CMV, og motsatt. På grunn av polyklonal B-celle-aktivering ved EBV-infeksjon er uspesifikk reaksjon i CMV-tester som følge av EBV-infeksjon hyppigst forekommende. I enkeltsituasjoner vil det likevel ofte være vanskelig å vurdere hvilket antistoff-funn som er det klinisk relevante. Foruten tester for heterofile antistoffer og EBNA-IgG kan funn i tidligere sera fra samme pasient gi viktig informasjon. Dersom det er betydelige forskjeller i signalstyrke mellom de to tester vil vi legge en viss vekt på dette. I spesielle situasjoner anbefaler vi EDTA-blod til PCR-undersøkelse for begge virus. Dette kan gi ytterligere holdepunkter, men PCR-resultater fra blodprøver må også tolkes med forsiktighet. Konklusjonen vil i noen tilfeller forbli forbeholden, og dette fører oftest til at vi anbefaler ny prøve om 1-2 uker.

1. Health Protection Agency. UK Standards for Microbiology Investigations. Epstein-Barr Virus Serology. London 2012.

Erfaringer med EBV-immunblot ved Sykehuset i Vestfold

Nils Grude, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset i Vestfold
Andreas Emmert, Unilabs Telelab

Oversikt over antall serologiske EBV-undersøkelser utført ved Sykehuset i Vestfold (SiV) i 2010/2011:

	2010	2011
Heterofile antistoffer	607	567
EBNA IgG	2522	2823
EBV VCA IgG	2521	2823
EBV VCA IgM	2521	2826
EBV immunblot IgG	130 (ca. 5%)	112 (ca. 4%)
EBV immunblot IgM	135	111

Så vidt oss bekjent finnes det to leverandører som tilbyr EBV-immunblot på markedet. Testen som brukes ved SiV er produsert av Mikrogen, distribuert av Orion diagnostica i Norge og heter recomline EBV IgG/M blot. Antigenene brukt her er:

IgG: EBNA-1, p18 (VCA), p23 (VCA), BZLF1 (IEA), p138 (EA) og p54 (EA).

IgM: p23, ZEBRA (IEA), p138 og p54.

Den andre EBV-immunblot på markedet heter Euroline EBV profile 2 (IgG/IgM).

Antigenene brukt her er:

EA-D, EBNA-1, VCA gp 125, p22 og VCA p19.

Vi fant ingen sammenligning av disse tester med hverandre eller sammenligning av testene med de eksisterende EIA-metoder i litteraturen.

Når utføres EBV-immunblotundersøkelse ved Mikrobiologisk avdeling, SiV?

Vi har ikke etablert faste retningslinjer med tanke på det aspektet. Legen med ansvar for utsvaring av EBV-serologi tar beslutning mhp indikasjon for videre undersøkelse av prøven med EBV-immunblot.

For å se nærmere på nytten/ betydningen av EBV-immunblot ved SiV gjennomgikk vi 42 EBV-immunblot undersøkelser utført i tidsrommet januar- mai2012 og så på følgende:

Årsak til EBV-immunblotundersøkelse:

EBNA+ IgG+ IgM+ heterofile antistoffer+	6
EBNA+ IgG+ IgM+ heterofile antistoffer - eller ukjent	6
EBNA- IgG+ IgM-	7
+/-funn (gråsoner)	10
EBNA+ IgG- IgM-	4
Andre (se neste side)	9

Hva faller under kategori andre?

1. Positive funn for både EBV og CMV hvor årsak til undersøkelse var avklaring mht kryssreaksjon: 1
2. EBNA+/- IgG + IgM - : 2
3. EBNA - IgG - IgM + heterofile - eller + : 2
4. EBNA - IgG + IgM + : 3
5. EBNA - IgG - IgM - : 1

Dokumentasjonen mhp sammenligning av EBV-immunblot og EIA i litteraturen er spinkelt (1).

Samsvar mellom resultatene i immunblot og EIA (tall fra SiV):

	Samsvar IgG-EIA (Novitech) og IgG-blot	Samsvar IgM-EIA (Novitech) og IgM-blot	Samsvar EBNA-EIA (Novitech) og EBNA-blot
Ja	32 (76%)	33 (79%)	25 (60%)
Nei	10 (24%)	8 (19%)	17 (40%)
Ikke utført	0	1	0

Resulterte gjennomføring av immunblotundersøkelse i at konklusjonen ble forandret?

Ja	Nei
24 (57%)	18 (43%)

Hovedforskjeller:

Sannsynlig falsk reaktivitet for EBNA i primærttesten	12 (55%). 18 positive og 4 grenseverdier totalt
Sannsynlig falskt positiv reaksjon for IgM i primærttest	7 (35%). Kun 1 grenseverdi
Sannsynlig falskt positiv reaksjon for IgG i primærttest	6 (16,6%). 29 positiv for IgG og 7 grenseverdi for IgG

Hvordan har utførelse av EBV-immunblot hatt innflytelse på tolkning av resultatene?

EBNA+ IgG+ IgM+ heterofile+	Tidligere gjennomgått infeksjon: 1 Aktuell infeksjon: 4 Samme funn i blot: 1
EBNA+ IgG+ IgM+ heterofile-	Tidligere gjennomgått infeksjon: 4 Aktuell infeksjon: 1 Samme funn i blot: 1
EBNA- IgG+ IgM -	Sannsynligvis tidligere gjennomgått infeksjon: 2 Falskt reaktiv IgG: 4 Kun p23 i IgG blot: Falskt reaktiv?

EBNA+ IgG - IgM -	Falskt reaktiv EBNA: 4
-------------------	------------------------

Var det hensiktsmessige å utføre EBV-immunblot?

Ja	Nei	Tja
32 (76%)	7 (17%)	3 (7%)

Sammenfatning:

Vi mener at immunblotundersøkelse er et viktig supplement i diagnostikken av en EBV-infeksjon fordi en ikke ubetruelig andel av EIA-undersøkelsene gir inkonklusive resultater (4-5%).

Blant disse førte immunblotundersøkelse i 57% av tilfellene til at konklusjonen i forhold til konklusjon/antakelse etter primærserologi ble forandret.

Ved usikkert resultat i primærserologi har videre utredning med immunblotundersøkelse vist seg svært nyttig hos oss.

Ved fortsatt uklart resultat bør deretter aviditetstesting og PCR-undersøkelse overveies.

På basis av de angitte usikkerhetene omkring EBNA ved bruk av Novitech vil en tro at reflekstesting er noe usikkert. Vi synes at videre forskning på feltet hadde vært spennende.

- (1) Cheung Wing Yi. Evaluation of immunoblot-based assay for the diagnosis of primary EBV infection. Master of medical science degree; University of Hong Kong 2010. <http://hub.hku.hk/handle/10722/132104>)

Diagnostikk av EBV-infeksjoner hos pasienter med immunsvikt

Ellen Holter, Avdeling for mikrobiologi, OUS, Rikshospitalet

Hvorfor diagnostikk av EBV-infeksjon? Fordi normalt immunforsvar, spesielt cytotoxiske T-celler, er av avgjørende betydning for å kontrollere EBV-infeksjoner. T-cellene vil normalt drepe de infiserte B-cellene, men ved nedsatt T-cellefunksjon (post-transplantasjon (post-tx), AIDS, medfødte immundefekter) fås ukontrollert, progressiv EBV-infeksjon, som kan føre til lymfoproliferasjon, ev. med malign utvikling. En manifestasjon etter tx er post transplantasjon lymfoproliferativ sykdom - PTLD. De fleste PTLD er EBV-medierte og av B-celleopprinnelse, sjeldnere av T-celleopprinnelse (1). Hodgkins lymfom og non-Hodgkins lymfom ligner det man ser hos immunkompetente, men er ved immunsvikt oftere assosiert med EBV (2). En god diagnostikk ved EBV-infeksjon har betydning for behandlingen.

EBV-assosierte tilstander og kliniske symptomer som kan sees etter transplantasjon, ved HIV og ved andre immunsvikttilstander:

Generelle symptomer som feber med eller uten andre symptomer.

Mononukleose med tonsillitt/forstørrede adenoider/forstørrede lymfeknuter/hepatitt/CNS-komplikasjoner (meningitt, encefalitt, Guillain-Barré syndrom).

Benign polyklonal B-celleproliferasjon er relativt vanlig, med feber, sår hals, lymfadenopati. Viser oftest tilbakegang ved reduksjon av immunsuppresjon (1).

EBV-lesjoner uten fullt utviklet PTLD i tarmtraktus kan gi blødninger som kan være livstruende.

EBV-assosiert colitt med bilde som inflammatorisk tarmsykdom (IBD). Dette forekommer også, men sjelden, hos immunkompetente (3).

PTLD kan være fokal eller multifokal (1) og kan skyldes primærinfeksjon, reaktivering, eller reinfeksjon med annen stamme. PTLD gir organmanifestasjoner etter hvilket organ (vanligste lokalisasjon er CNS, G-I-traktus, transplantatet, luftveier), og kan gi obstruksjonssymptomer og redusert transplantatfunksjon. Utviklingen er ofte rask! Frekvens av PTLD er angitt å være fra 1-10 % (4). Risikoen er større ved primærinfeksjon enn ved reaktivering, og større jo kraftigere immunsuppresjonen er.

Monoklonalt B-cellelymfom kan utvikles i transplantatet eller hvor som helst. Ofte behandlingsrefraktære (1).

Oral hårcelleleukoplaki gir epitelial hyperplasi med hvite lesjoner på tunge og i munnhule. Oftest benign tilstand (1), (5).

Leiomyom eller leiomyosarcom i glatt muskulatur (6).

Hodgkins lymfom, non-Hodgkins lymfom (2)

Antistoffpåvisning, immunstatusundersøkelse: Bør utføres hos organdonor og -mottaker. Laboratoriet bør gjøre oppmerksom på at testene ikke skiller mellom egenproduserte antistoffer, maternelle antistoffer og passivt tilførte antistoffer. Hos de fleste med tidligere gjennomgått infeksjon kan man påvise EBNA-IgG-antistoffer, men i tilfeller hvor disse er sunket til under påvisbart nivå, kan man så godt som alltid påvise VCA-IgG.

Diagnostikk ved overvåking og sykdomsutredning

EBV PCR: brukes både i overvåking og i sykdomsutredning. Materialer: EDTA-blod, spinalvæske, biopsier. Det diskuteres om PCR bør utføres i EDTA-fullblod eller plasma. Analysen er mer sensitiv i fullblod enn i plasma, og kvantiteringen i fullblod korrelerer godt

med kvantitering i mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) (7), (8). Vi bruker EDTA-fullblod, da våre barneleger ønsker mest mulig sensitiv PCR.

Antistoffpåvisning ved sykdomsutredning: Ved primærinfeksjon: Anbefales ikke alene, men eventuelt som supplement til PCR. IgM-respons kan være sen eller manglende, VCA-IgG- og EBNA-IgG serokonversjon kan opptre sent, noen ganger forbausende sent, og man kan ikke skille mellom passivt tilførte og egenproduserte antistoffer. Ved reaktivering: Anbefales ikke.

Aviditetsanalyse av IgG-antistoff (9) kan være et supplement hvis det (likevel) utføres antistoffanalyser: Høy aviditet hos IgM-positive er forenlig med reaktivering av tidligere infeksjon, og lav aviditet hos IgM-negative er forenlig med mulig aktuell infeksjon. Det vil likevel være tolkningsproblemer, og nytten synes begrenset.

Blodutstryk ved sykdomsutredning er upålitelig, da T-celleresponsen med CD8+ lymfocytter, som hos immunkompetente gir den karakteristiske lymfocytosen, er svekket (1).

Immunhistokjemisk påvisning av B-cellemarkører (CD20, CD79A) i biopsier.

In situ hybridisering for påvisning av EBV-RNA i biopsier fra EBV-suspekterte lesjoner og tumores for å avklare om de er EBV-relatert. Ved Barneklubben, RH rekvireres noen ganger slik analyse i forbindelse med PTLD-diagnostikk.

CD8+ cytotoxiske T-celler. Parallelt med økende virustiter forut for PTLD-utvikling sees avtagende antall uspesifikke og EBV-spesifikke cytotoxiske T-celler (10). Og omvendt: Parallelt med avtagende virustiter i blod som følge av behandling sees økning i antall cytotoxiske T-celler. Dette kan benyttes som supplement til EBV-PCR (11)

CXCL13, et kjemokinin som uttrykkes ved en del lymfoproliferative tilstander, påvises i serum og korrelerer med utvikling og tilbakegang av PTLD (12). Foreløpig ikke brukt av klinikerne i Norge.

Klinisk overvåking av adenotonsillær hypertrofi som tidlig tegn på primær EBV-infeksjon: To studier om immunhistokjemi og in situ hybridisering i tonsillevev viser at halvparten av pre-tx seronegative barn hadde EBV-infeksjon (påvist EBER i tonsillevevet) (13), (14).

Mest brukt i Norge er kvantitativ EBV-PCR i blod og eventuelt i spinalvæske, og kvalitativ PCR fra lesjoner og tumores, eventuelt supplert med in situ hybridisering ved PTLD-diagnostikk. Immunhistokjemisk påvisning av B-cellemarkører utføres også i Norge.

Hvor ofte prøver: Det finnes ingen vedtatte retningslinjer, verken nasjonalt eller internasjonalt, for hyppighet ved overvåking. Fornuftig hyppighet avhenger av grad av risiko for PTLD, som igjen avhenger av alder, immunstatus før tx, immunstatus hos organonor, hvilket organ som transplanteres, grad av immunsuppresjon.

Barneklubben ved RH bruker: 2x/uke så lenge barnet er innlagt, dvs 6-8 uker. Deretter kontroller hos fastlege, men ingen nedskrevne retningslinjer for hyppighet av PCR-analyser. Hver 2.-4. uke til 6 måneder etter tx, deretter hver 4.-8. uke til 12 måneder, synes fornuftig. Det tas PCR ved kontroller ved Barneklubben, RH, 3-6-12 mnd etter tx, deretter en gang årlig ved senere årskontroller. For øvrig alltid ved symptomer. Dette vil i de fleste tilfeller være tilstrekkelig, også når organmottaker er seronegativ. Hos seropositive, voksne organmottakere med mildeste form for immunsuppresjon vil det være forsvarlig med sjeldnere kontroller.

Prøvematerialer: Serum for antistoffpåvisning. EDTA-blod for EBV-PCR. Vi bruker fullblod for DNA-ekstraksjon, se ovenfor. Biopsier for EBV-PCR. Biopsier for immunhistokjemi og hybridisering (patolog). Biopsiene tas fra EBV-suspekterte lesjoner med eller uten utviklet PTLD.

Forsendelse: Som ellers for biologisk materiale, for øvrig uten spesielle forholdsregler: Virustransportmedium i sterilt glass.

Tolkning og konsekvenser

Betydningen av funn i biopsi: Har positiv PCR alltid klinisk betydning?

Studie fra 2003 (15) viste at bare de som hadde andre tegn på EBV-infeksjon hadde positiv PCR. Andre tegn på EBV-infeksjon var septisk bilde, multiorgansvikt, pneumonitt, mononukleose, lymfadenopati, kronisk tretthet, EBV-nejfritt, økende serum-kreatinin.

En studie fra 2005 (16) viste at funn av EBV i nyrebiopsi korrelerte med interstitiell fibrose og tubulær degenerasjon/atrofi. Likevel bør nok lave kopiantall tolkes med forsiktighet. Falskt positive resultater pga. tilstedeværelse av blod i materialet er lite sannsynlig. Nødvendig volum i blodprøver til kvantitativ PCR er minst 250 mikroliter.

Betydningen av funn i spinalvæske: EBV kan forårsake encefalitt både hos immunkompetente og immunkompromitterte pasienter (17), men kan også reaktiveres uten påvisbar klinisk betydning i forløpet av annen sykdom i CNS (18). Spesielt bør lave kopiantall tolkes med forsiktighet.

Betydningen av funn i EDTA-blod: Har positiv PCR alltid klinisk betydning? Ved starten av immunosuppressiv behandling sees ofte positiv EBV-PCR uten klinisk betydning (19). Det er ofte korrelasjon mellom antall kopier og symptomer, men ikke alltid. Ca. tre uker før utvikling av PTLD sees ofte markant økning i antall viruskopier (20). Økning i kopiantall kan også sees uten PTLD-utvikling, og PTLD-utvikling kan sees uten forutgående økning i virustiter (21).

Konsekvenser: Ved lavt antall viruskopier i EDTA-blod, ved vårt laboratorium definert som lavere enn 12500 kopier/ml, reduseres immunsuppresjon til lavest mulig nivå. Ved markant økning av kopiantallet anbefales ett eller flere av følgende tiltak: Fortsatt lavest mulig immunsuppresjon, lokal kirurgisk behandling, strålebehandling, anti-B-cellebehandling (anti-CD20, rituximab) som nå er en etablert behandling (22), tilførsel av EBV-spesifikke, cytotoxiske T-celler som også er en etablert behandling (23). Hva som er ”markant økning” vil variere avhengig av analysens variasjonskoeffisient (CV %). I vårt laboratorium med stor inter-assay variasjon menes økning mer enn 1 log. Vi har sett kopiantall på 100 000 kopier/ml eller mer, oftest, men ikke alltid, relatert til kliniske symptomer.

Anbefalinger

EBV-immunstatusundersøkelse hos organmottaker og -donor. Hvis anti-EBNA negativ: Utfør anti-VCA-IgG.

EBV-PCR i EDTA-blod som regelmessig overvåking, og ved symptomer.

EBV-PCR i biopsier/spinalvæske ved aktuelle symptomer.

EBV-antistoffundersøkelse som supplement ved primærinfeksjon. Av liten eller ingen verdi ved reaktivering.

Referanser:

1. Richman, Whitley, Hayden Clinical Virology Second Edition 2002.
2. Cesarman E. Cancer Lett 28: 163-74, 2011.
3. Karlitz JJ. et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8: 50-4, 2011.
4. Végső G. et al. Pathol Oncol Res 17: 443-54, 2011.
5. Petti S. et al. Oral Dis (epub ahead of print) 2012.

6. Shaw RK. et al. *Blood* 119: 4009-12, 2012.
7. Hakim H. et al. *J Clin Microbiol*, 2151-55 2007.
8. Ruf S. et al. *J Clin Virol* 53: 186-94, 2012.
9. Vilibik-Cavlek T. et al. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58: 351-7, 2011.
10. Sato T. et al. *Clin Nephrol* 70: 393-403, 2008.
11. Imadome KI. et al. *Pediatr Transplant* 10.1111: 16: 748-57, 2012.
12. Schiffer L. et al. *Am J Transplant* 12: 1610-17, 2012.
13. Mowry SE. et al. *Arch otolaryngol Head Neck Surg* 134: 936-9, 2008.
14. Shapiro NL. et al. *Laryngoscope* 121: 1718-25, 2011.
15. Gupta M. et al. *Am J Kidney Dis* 41: 212, 2003.
16. Sebekova K. et al. *Pediatr Transplant* 9: 598-603, 2005.
17. Martelius T. et al. *BMC Infect Dis* 11: 281, 2011.
18. Sundén B. et al. *BMC Infect Dis* 11: 220, 2011.
19. Leung E. et al. *Transpl Infect Dis* 6: 156-64, 2004.
20. Holman CJ. et al. *Clin Transplant* 10: 1399-0012 (epub ahead of print) 2012.
21. Calabrese F. et al. *Transpl Infect Dis* 12: 342-6, 2010.
22. Hatton O. et al. *Pediatr Transplant* 16: 220-9, 2012.
23. Pagliara D, Savoldo B. *Curr Opin Infect Dis*. 25: 431-7, 2012.

EBV-PCR

Svein Arne Nordbø, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital, Trondheim

Epstein-Barr-virusinfeksjoner hos immunkompetente personer medfører sjelden livstruende sykdom, og i de fleste tilfellene er det tilstrekkelig å basere diagnostikken på tradisjonell serologi (1,2).

Hovedindikasjonen for bruk av PCR (fortrinnsvis kvantitativ PCR) er monitorering av EBV-infeksjoner hos pasienter med nedsatt immunforsvar, både med henblikk på prognose og behandlingseffekt (2). Også i tilfeller med primærinfeksjon (mononukleose i tidlig stadium) og inkonklusiv serologi kan PCR være et nyttig diagnostisk supplement.(3,4) Ved primærinfeksjon når virusmengden en topp innen 2 uker. Viremiens varighet er svært variabel, fra få uker til mange måneder (1). Deteksjon av EBV-DNA i kliniske prøver er uttrykk for en aktiv virusreplikasjon og kan være nyttig i vurderingen av kroniske EBV-infeksjoner og diagnostikk av EBV-relaterte tumores.

De fleste laboratorier benytter i dag real-time PCR til påvisning av EBV-DNA i kliniske prøver da denne teknikken er rask, meget sensitiv og spesifikk, og godt egnet til både semikvantitative og kvantitative analyser (1). Kvalitative analyser som har en repetert gensekvens som målområde er meget sensitive og kan i teorien påvise latent EBV-genom i mononukleære celler hos pasienter som tidligere har gjennomgått en EBV-infeksjon, og svake utslag (høy Ct-verdi) må derfor vurderes med forsiktighet. I praksis viser det seg imidlertid at EBV-PCR vanligvis er negativ i blodprøver fra friske personer selv om de fleste har antistoffer mot EBV (2).

Egnet prøvemateriale til kvantitative analyser er først og fremst blod og spinalvæske. Både helblod (EDTA-blod), serum, plasma eller mononukleære celler kan benyttes, men det er ingen konsensus om hvilket prøvemateriale som egner seg best til kvantitative målinger (1). Av praktiske grunner benytter de fleste diagnostiske laboratoriene helblod eller serum/plasma til disse analysene. Virusmengden i blod og spinalvæske er som regel relatert til den kliniske alvorlighetsgraden, men det er store individuelle variasjoner. Den kliniske betydningen av kvantitative undersøkelser av annet prøvemateriale som f. eks. biopsier og halsprøver er beheftet med betydelig større usikkerhet.

Virusmengden kan variere en god del over tid hos pasientene og kvantitative målinger bør derfor vurderes med forsiktighet. Det er viktig å standardisere ekstraksjonen og fortrinnsvis bruke kommersielle automatiserte ekstraksjonsmetoder (1). Kvantitative metoder bør kalibreres mot en internasjonal standard og inkludere en intern amplifikasjonskontroll. Det er viktig at målsekvensen er konserverert og ikke repetert i EBV-genomet.

Alvorlige EBV-infeksjoner kan forekomme hos immunsupprimerte pasienter, spesielt hos transplantasjonspasienter, AIDS-syke og personer med medfødt immunsvikt. Spesielt høye verdier av EBV-DNA kan man se ved kroniske aktive EBV-infeksjoner og posttransplantation lymphoproliferative disorder (PTLD). Ukontrollert PTLD etter en transplantasjon kan ha høy mortalitet. Studier har vist at kvantitative analyser av EBV-DNA i plasma hos disse pasientene er en viktig prognostisk markør mht utvikling av PTLD, og kan også benyttes til monitorering av behandlingseffekten ved alvorlige EBV-infeksjoner (2).

Påvisning av EBV-DNA i biopsier kan være til hjelp i tumordiagnostikken, men denne diagnostikken utføres mest pålitelig med andre metoder (EBER in situ hybridisering). Ved EBV-DNA kvantitering i vevsprøver bør man angi antall kopier pr. µg DNA eller justere verdien i relasjon til mengden av et endogent humant gen i samme prøve (1,2).

Alternative metoder som RT-PCR og NASBA for påvisning av EBV-transkripter er lite brukt i rutinediagnostikken.

Ved overvåkning av pasienter med nasofaryngealt karsinom anbefales det å benytte plasma til kvantitative analyser (1).

Referanser:

1. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008; 10: 279-92.
2. Gärtner B, Preiksaitis JK. EBV viral load detection in clinical virology. *J Clin Virol* 2010; 48: 82–90.
3. Vouloumanou EK, Rafailidis PI, Falagas ME. Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol.* 2012; 19:14-20.
4. Berth M, Vanheule G, Depuydt C, et al. Serum Epstein-Barr virus (EBV) viral load can be a complementary sensitive test in primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* 2011; 50:184–185.

Diagnostikk av EBV-infeksjon ved Avdeling for patologi

Signe Spetalen, Avdeling for patologi, Oslo universitetssykehus

Epost: uxigsp@ous-hf.no

Påvisning av EBV i biopsimateriale er viktig ved flere typer problemstillinger. Dette inkluderer forstørrede lymfeknuter der vevsforandringene kan gi mistanke om mononukleose, vevsprøver fra pasienter med immunsvikt (spesielt ved mistanke om post-transplantat lymfoproliferativ sykdom) og maligne svulster (særlig lymfomer og nasofaryngealt karsinom).

Nesten alle voksne mennesker er infisert med EBV, og hos friske bærere ligger viruset latent i en liten andel av B-cellene. For patologen innebærer dette at man i alle vevsprøver som inneholder B-celler, normalt vil kunne påvise en og annen EBV-positiv celle.

Det finnes ulike metoder for å påvise EBV i biopsi-materiale, bl.a. in situ hybridisering, immunhistokjemi og PCR-baserte teknikker. "Gullstandarden" er påvisning av de ikke translatiserte transkriptene EBV-encoded RNA (EBER1 og EBER2) ved in situ hybridisering (ISH) (1,2). Resultatet av ISH visualiseres i mikroskopet. Patologen kan dermed bestemme hvilke celletype(r) som er infisert og mengden infiserte celler i vevssnittet. Denne visuelle kontrollen er svært viktig for å bedømme den medisinske betydningen av EBV-infeksjonen. EBER uttrykkes pålitelig både i latent infiserte celler samt i praktisk talt alle benigne og maligne EBV-infiserte lesjoner, med unntak av oral håret leukoplaki. Falskt negativt resultat kan oppstå dersom RNA er degradert. ISH for påvisning av EBER brukes i dag ved de større sykehusene i Norge, og det finnes flere kommersielt tilgjengelige systemer for påvisning av ett eller begge EBER.

Immunhistokjemiske teknikker kan lokalisere EBV-protein i biopsi-materiale (1). Antistoffer mot flere latente og lytiske faktorer er tilgjengelig. Som ved ISH tillater denne metoden å lokalisere det undersøkte proteinet i relasjon til histopatologiske funn. Et av de antistoffene som har vært mest benyttet er rettet mot EBV latent membran protein type 1 (LMP1).

Imidlertid uttrykkes verken dette eller andre tilgjengelige EBV-proteiner i alle celler som er EBV-infiserte. Siden immunhistokjemi oppfattes å være mindre sensitiv enn ISH, benyttes dette lite i rutinediagnostikken av EBV-infeksjon ved de store norske patologi-avdelingene i dag.

EBV-DNA kan påvises ved hjelp av real-time PCR (1). Dette gjøres ikke ved patologi-avdelinger i Norge, men biopsi kan sendes til mikrobiologiske avdelinger. Metoden er bedre egnet enn ISH dersom RNA er dårlig bevart og ved rene lytiske infeksjoner som mangler EBER-transkripter. Ulempen ved en slik metode er at man ved et blandet cellebilde ikke kan visualisere hvilke celler som er infisert.

Selv om de tilgjengelige metodene for påvisning av EBV-infeksjon ved patologi-avdelinger er nokså pålitelige, kan det være vanskelig å vurdere betydningen av infeksjonen. Ikke minst kan grenseoppgangen mellom mononukleose og EBV-positivt lymfom være ytterst krevende. I slike tilfeller er samarbeid mellom ulike spesialister, inkludert pasientbehandlende lege, patolog og mikrobiolog, viktig.

Referanser:

1. Gully ML, Tang W: Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 2008;10:279-292
2. Ambinder R, Mann RB: Epstein-Barr-encoded RNA in situ hybridization: Diagnostic applications. *Human Pathology* 1994;25:602-605.

EBV i kombination med HIV - vad blir det?

Birgitta Åsjö, Mikrobiologisk avdelning, Haukeland Universitetssjukehus, Bergen

Infektion med Epstein-Barr-virus (EBV), ett lymfotrop virus som hör till herpesfamiljen, är vanligt förekommande med en seroprevalens på c:a 90% i den generella befolkningen. Det är intressant att EBV har stora likheter med endemiskt förekommande lymfocryptovirus bland rhesus apor och chimpanser (1, 2) och liksom HIV kan EBV ha ett "simian" ursprung.

Efter primärinfektion etableras ett livslångt oftast asymptomatiskt förhållande mellan virus och cirkulerande vilande minnes B-celler. Antalet EBV+ cirkulerande celler är vanligen mycket stabilt över tid (0,5 – 50 EBV+ celler per miljon B-celler) och man kan tala om individuella "set-points" efter primärinfektion. Detta återspeglar en noga kontrollerad jämvikt mellan B-cellsinfektion/proliferation och immunsystemet representerat av cytotoxiska CD8+ (CTL) celler (3, 4). Störningar av denna jämvikten t.ex. vid immunsvikt kan leda till okontrollerad proliferaion och vidare utveckling till EBV-medierat non-Hodgkins lymfom (NHL) hos transplantationspatienter men också hos HIV+ patienter.

Det visar sig att de bakomliggande mekanismerna är olika för dessa patientgrupper (4).

Immunsuppression i samband med transplantation kan leda till NHL pga proliferaion av EBV-infekterade B-celler, som normalt skulle elimineras av CD8+ CTL. Restitution av EBV-specifika CD8+ CTL, antingen genom sänkt immunsuppression (patientens egna celler) eller infusion av donorlymfocyter, leder till att EBV-nivåerna reduceras raskt och därmed sjunker risken för NHL. Vid **immunsuppression pga HIV-infektion** är det istället en kombination av störd B-cellsfunktion med polyklonal hypergammaglobulinemi, en ökad B-cell stimulering och ökad EBV-reakivering samman med förlust av CD4+ celler i antal och CD4-hjälpsfunktion till CD8+ celler, som har betydelse för utveckling av NHL. Vanligen är dessa systemiska eller lokaliserade till CNS och risken är 60 – 100 gånger högre för lymfom hos HIV+ patienter jämfört med HIV- kontrollpersoner (5).

Antiviral behandling (HAART) har påtagligt reducerat både förekomst och behandlingsprognosen av EBV-relaterade lymfom hos HIV+ patienter men effekten på EBV-DNA nivåer är mer beskednen (6,7).

Jämfört med friska kontrollpersoner har HIV+ personer ofta ett högre antal EBV-infekterade B-celler både i perifert blod och i lymfatisk väv. Studier har vist att efter en primär HIV-infektion ökar antalet EBV+ B-celler ca 4x hos patienterna och denna nivå ligger förhållandevis stabilt över tid. D.v.s. att individuella EBV-DNA "set-points" före HIV-infektion har behållits efter serokonversion och även efter HAART. Det har bara blivit en parallellförskjutning till högre numeriskt värde (8) och kan möjligen förklara varför EBV-DNA nivåer inte tycks ha prediktivt värde för utveckling av lymfom hos HIV+ patienter till skillnad mot transplantationspatienter (4, 9). Start av antiviral behandling bör ske tidigt, CD4+ celler >300/ul blod för att återskapa CD4-hjälp till EBV-specifika CD8+ CTL.

Förutom att HIV-infektionen i sig leder till polyklonal aktivering av B-celler så kan också vaccinering leda till en både specifik, men också polyklonal aktivering. Därmed kan vaccination i sig ha en synergistisk effekt med HIV på B-cellsaktivering. En intressant studie, med terapeutisk gp160 rekombinant vaccin och alum som adjuvant givet 12 – 16 gånger under en 3-årsperiod och en placebo grupp med endast adjuvant, visade en stor interindividuell variation i EBV-DNA nivåer (10.000 x variation). Patienter med en symptomatisk primär HIV-infektion hade generellt högre EBV-nivåer. HAART hade ingen effekt på EBV-nivåer. Vad detta betyder över tid är för tidigt att säga men författarna rekommenderar EBV-DNA analys i uppföljningen av patienter som inngår i terapeutiska vaccinstudier (10).

Sammanfattning:

- a) HIV-infektion leder vanligtvis till ökning av antalet EBV+ B-celler och en påtagligt ökad risk för utveckling av NHL
- b) HAART reducerar, men eliminerar inte risken för uppkomst av EBV-relaterad NHL och behandlingen har lite effekt på EBV-nivåerna (kanske på lång sikt).
- c) EBV-DNA kvantitering ger liten/ingen information om risken för utveckling av NHL i uppföljningen av HIV+ patienter som står på antiviral behandling
- d) EBV-serologi har ingen plats i uppföljningen av HIV+ patienter
- e) HIV-infektion leder till defekter i B-cellsfunktioner och polyklonal aktivering, som kan förvärras av upprepade immuniseringar. Det kan därför vara aktuellt att monitorera EBV-DNA nivåer i uppföljningen av patienter som deltar i terapeutiska vaccinstudier.

Referenser:

1. Moghaddam A, Rosenzweig M, Lee-Parritz D, Annis B, Johnson RP, Wang F. An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science*. 1997 , 276:2030-3.
2. Wang F. A new animal model for Epstein-Barr virus pathogenesis. *Curr top Microbiol Immunol* 2001, 258:201-19.
3. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000, 343:481-92.
4. Pietersma F, Piriou E, van Baarle D. Immune surveillance of EBV-infected B cells and the development of non-Hodgkin lymphomas in immunocompromised patients. *Leuk Lymphoma*. 2008, 49:1028-41.
5. Piriou E, Jansen CA, van Dort K, De Cuyper I, Nanlohy NM, Lange JM, van Oers MH, Miedema F, van Baarle D. Reconstitution of EBV latent but not lytic antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells after HIV treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol*. 2005, 175:2010-7.
6. Kirk O, Pedersen C, Cozzi-Lepri A, Antunes F, Miller V, Gatell JM, Katlama C, Lazzarin A, Skinhøj P, Barton SE; EuroSIDA Study Group. Non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood*. 2001, 98:3406-12.
7. Polesel J, Clifford GM, Rickenbach M, Dal Maso L, Battegay M, Bouchardy C, Furrer H, Hasse B, Levi F, Probst-Hensch NM, Schmid P, Franceschi S; Swiss HIV Cohort Study. Non-Hodgkin lymphoma incidence in the Swiss HIV Cohort Study before and after highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2008, 22:301-6.
8. Piriou ER, van Dort K, Otto SA, van Oers MHJ, van Barle D. Tight regulation of the Epstein-Barr Virus setpoint: interindividual differences in EBV DNA load are conserved after HIV infection. *Clin Inf Dis* 2008, 46:313-16.
9. Piriou ER, van Dort K, Nanlohy NM, Miedema F, van Oers MH, van Baarle D. Altered EBV viral load setpoint after HIV seroconversion is in accordance with lack of predictive value of EBV load for the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Immunol*. 2004, 172:6931-7.

10. Friis AM, Akerlund B, Gyllensten K, Aleman A, Bratt G, Sandström E, Ernberg I. Epstein-Barr virus genome load is increased by therapeutic vaccination in HIV-1 carriers, and further enhanced in patients with a history of symptomatic primary infection. *Vaccine*. 2012 Aug 1.

EBV-infeksjon: Uvanlige kliniske manifestasjoner og komplikasjoner

Anne Ma Dyrhol Riise, Infeksjonsmedisinsk avdeling, Oslo Universitetssykehus

Infeksjon med Epstein-Barr-virus (EBV) har ulike kliniske manifestasjoner. Hos barn er ofte EBV-infeksjonen asymptomatisk, mens det hos tenåringer og unge voksne klassisk opptrer som infeksøs mononucleose med feber, lymfadenopati, tonsilitt/faryngitt og ”fatigue”. Objektive somatiske og laboratorie undersøkelser viser faryngitt, cervical lymfadenopati, moderat absolutt og atypisk lymfocytose og lett økte transaminaser som vanligvis normaliseres innen en måned. Tradisjonelle tegn som feber og splenomegali kan utebli. Selv om 95% av tilfellene forløper ukomplisert og er selvbegrensende, så kan varighet og alvorlighetsgrad variere mye. Flere organsystem kan affiseres ved akutt sykdom og i ca 5% av tilfellene opptrer komplikasjoner. Akutt kan det forekomme miltruptur, luftveisobstruksjon, fulminant hepatitt eller uttalt utslett. Nevrologiske komplikasjoner som aseptisk meningitt, encephalitt, Guillain-Barré syndrom og nevritter kan forekomme og hematologiske abnormaliteter som trombocytopeni, aplastisk anemi, TTP/HUS og DIC er observert. Likeledes myositt, myo/pericarditt, akutt nyresvikt og glomerulonefritt. Lymfoproliferative tilstander kan utvikles og være alvorlig og fatal ved sjeldne genetiske tilstander som påvirker EBV-spesifikk immunitet og pasienter med EBV-infeksjon har økt risiko for å utvikle maligniteter som lymfom. Diagnosen stilles med en kombinasjon av EBV-spesifikk serologi, PCR og histologi og immunhistokjemi av biopsier. EBV-infeksjon og noen av dens mer sjeldne manifestasjoner og komplikasjoner vil bli gjennomgått.

Referanser:

1. Rea TD et al. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J Am Board Fam Pract.* 2001;14(4):234.
2. Grose C. The many phases of infectious mononucleosis; the spectrum of Epstein-Barr virus infection in children. *Pediatr Rev.* 1985;7:35.
3. Okano M et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol.* 2005;80(1):64.
4. Braz J. *Infect Dis.* A rare clinical presentation of Epstein-Barr virus. *Oncel C.* 2010 Mar-Apr;14(2):211-2.
5. Andréoletti L et al. Viral causes of human myocarditis. *Archives of Cardiovascular Disease* 2009; 102, 559—568.
6. Sabbatani S et al. Myopericarditis during a primary Epstein-Barr virus infection in an otherwise healthy young adult. An unusual and insidious complication. Case report and a 60-year literature review. *Infez Med.* 2012 Jun;20(2):75-81.

Epstein-Barr Infeksjon

"uvanlige tilstander av EBV"

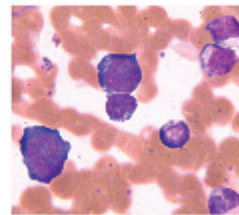
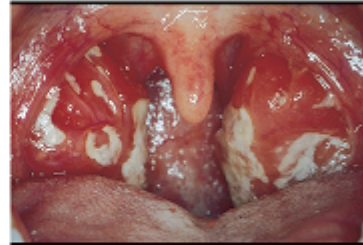
Anne Ma Dyrhol Riise
Infeksjonsavdelingen
Oslo Universitetssykehus

Møte "Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi"
Lovisenberg sykehus 1. 11.12

Akutt infeksiøs mononucleose

- Slapphet, hodepine, feber
- Tonsillitt og/eller faryngitt
 - grå/grønt-nekrotisk eksudat
- Forstørrede/øsmme sym. lymfeglandler
- Peteccier i gane, periorbitalt ødem
- Makulopapulært eller morbilliform utslett
 - 70% risiko etter B-laktam antibiotika
- G.I: symptomer:
 - Hepatitt: kvalme, oppkast, anorexia (90 %)
 - Icterus eller hepatomegali sjelden
 - Splenomegali (50%)
- Atypisk lymfocytose

- Akutt symptomer opphører etter 1-2 uker
- Fatigue kan vedvare i mnd (13 % etter 6 mnd*)
- Utvikler langvarig immunitet



*]Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. Rea TD et al. J Am Board Fam Pract. 2001;14(4):234.

Symptomer og tegn ved EBV

Symptoms and signs	Frequency, percent
Symptoms	
Malaise and fatigue	90-100
Sweats	80-95
Sore throat, dysphagia	80-85
Anorexia	50-80
Nausea	50-70
Headache	40-70
Chills	40-60
Cough	30-50
Myalgia	12-30
Ocular muscle pain	10-20
Chest pain	5-20
Arthralgia	5-30
Photophobia	5-30
Signs	
Adenopathy	100
Fever	80-95
Pharyngitis	65-85
Splenomegaly	50-60
Bradycardia	30-50
Periorbital edema	25-40
Palatal exanthem	25-35
Liver and spleen tenderness	15-30
Hepatomegaly	15-25
Rhinitis	10-25
Jaundice	5-30
Skin rash	5-15
Myocarditis	<5

Modified from Charvenik, *Am J Dis Men* 1976; 1:29

Kliniske former for EBV-infeksjon

- **Glandular (tyfoid) form:**
 - feber og lymfadenopati uten faryngitt
 - “heterofil negativ EBV”
 - diff: CMV, HIV, TOXO, HHV-6/HHV-7
- **Systemisk form:**
 - feber og slapphet
- **Unge/eldre:**
 - faryngitt og myalgi
 - langvarig feber hos eldre

ADAM

EBV hos barn og i svangerskap

- Primær infeksjon ofte asymptomatisk hos små barn
 - Otitis media, diare, abdominal smerte, øvre luftveisinfeksjon og IM
- EBV infeksjon uten heterofile antistoff, men EBV-spesifikke a.s pos
- Serologi kan være vanskelig å tolke for barn < 2 år*.
 - Anti-viral capsid antigen (VCA) IgM sjeldnere pos hos spebarn enn eldre barn (60% vs 100 %)
- EBV-spesifikk cytotoxisk T lymfocytt respons hos spebarn med akutt EBV

- Liten risiko for forsterskade ved EBV infeksjon hos mor under svangerskap
 - < 5 % av kvinner har risiko for primær IM
 - Transplacental overføring av EBV sjelden
 - Sjeldne tilfeller av kongenitale misdannelser sett (biliær atresi, hjertesykdom, karatakt, hypotoni), men årsakssammenheng uklar.

*] The many phases of infectious mononucleosis; the spectrum of Epstein-Barr virus infection in children
Grose C Pediatr Rev. 1985;7:35.

Kronisk aktiv EBV infeksjon

- Persisterende IM symptomer og aktiv EBV infeksjon
 - Feber, lymfeglandelsvulst, hepatosplenomegali
 - Forhøyede levertransaminaser, cytopenier
 - Høye nivå av EBV-DNA i blod

- OBS! "Fatigue" og positiv EBV serologi alene er ikke diagnostisk.

Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. Okano M et al. Am J Hematol. 2005;80(1):64.

Komplikasjoner

- Akutte komplikasjoner
 - Miltruptur, luftveisobstruksjon, utslett
- **Nevrologiske**
 - aseptisk meningitt, encephalitt, Guillain-Barré syndrom, nevritter
- Immunologiske
- **Lymfoproliferative tilstander**
- Hematologiske abnormaliteter
 - hemolytisk anemi, trombocytopeni, aplastisk anemi, TTP/HUS, DIC.
- Hepatitt (fulminant), pancreatitt, mesenterieadenitt
- Myositt
- **Myo/pericarditt**
- Akutt nyresvikt, glomerulonefritt
- **Malignitet**

Komplikasjoner til EMB infeksjon

Cardiac	Myocarditis, pericarditis, arrhythmias
Dermatologic	Ampicillin-associated rash, oral hairy leukoplakia
Hematologic	Hemolytic anemia, thrombocytopenia, neutropenia, aplastic anemia
Hepatic	Hepatitis, Reye's syndrome
Immunologic	Decreased cell-mediated immunity, lymphoproliferative syndromes, Burkitt's and non-Hodgkin's lymphomas
Neurologic	Encephalitis, Guillain-Barré syndrome, Bell's palsy, psychosis, optic neuritis, transverse myelitis, seizures
Renal	Glomerulonephritis, interstitial nephritis
Respiratory	Upper airway obstruction, interstitial pneumonitis, pneumonia
Splenic	Spleen rupture both spontaneous or after mild abdominal trauma

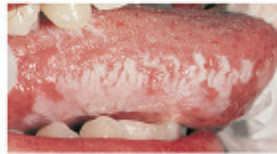
Source: References 4, 19.

Hud komplikasjoner

- **Utslett**
 - Makulopapulært, urticaria, peteccier.
 - Sjelden erythema nodosum.
 - Reaksjon på B-laktam antibiotika ++ (ikke allergi)



- **“Oral hairy leukoplakia”**
 - Smertefri plaque, sitter fast
 - Vanligvis HIV-relatert
 - Ass med intens EBV replikasjon



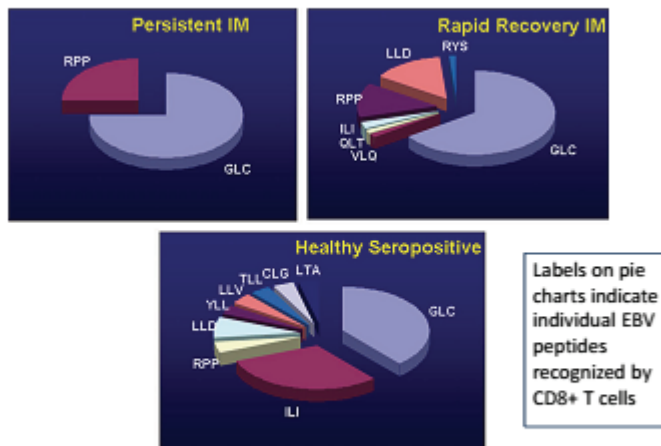
Source: Longo DZ, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo B, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition. New York: McGraw-Hill Education; 2015. Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Akutt komplikasjoner

- **Miltruftur:**
 - sjeldent, men pot. fatalt
 - 1-2:1000
 - menn > kvinner
 - 4-21 dag
 - spontant hos > 50%
 - Ikke korrr. til klinisk sykdom
 - 50% ikke palp. forstørret (økt x 2-3)
 - Magesmerter, fallende hematokrit.
- **Behandling**
 - Konservativ intensiv
 - Splenektomi

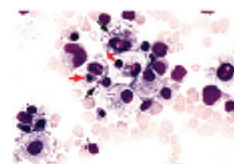


Lymfoproliferative tilstander ved EBV infeksjon



Ref: J. I. Cohen. Review. EBV-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 2008. *Annals of Oncology* 20: 1472–1482, 2009

Lymfoproliferative tilstander I



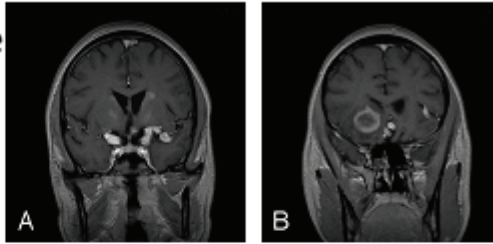
Benmarg.
Fagocytose av
erythrocytter

- **Hemophagocytisk lymfohistiocytose**
 - Potensiell fatal genetisk tilstand ass med EBV.
 - Histocytisk proliferasjon (T-celler) og hemophagocytose.
 - Feber, gen. lymfadenopati, hepatosplenomegali, hepatitt, pancytopeni, koagulopati.

- **Lymfomatoid granulomatose**
 - Angiodestruktiv sykdom i lymfesystem ass med EBV
 - Klonal B celle proliferasjon
 - Ass med primær eller sek. immunsvikt (HIV).
 - Feber, hoste, vektap, parenchym/CNS påvirkning

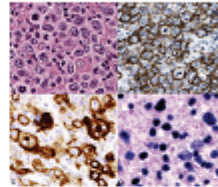
Tidsskr Nor Legeforen 2011; 131:2482-6. Noe å lære av En 15 måneder gammel jente med feber og pancytopeni. M K Skram, S Bjering, NO, Hermansen, L Dini, M Hellebostad

Lymfoproliferative tilstander II



- **X-linked lymfoproliferativ sykdom**
 - Sjelden selektiv immunsvikt for EBV – fatal IM hos gutter (1–2: 1 mill)
 - Gen defekt som fører til defekt apoptose og CD8 T celle proliferasjon
 - 3 fenotyper fulminant MI (46%), dysgammaglobulinemia (23%) og lymfom (22.3%), Bildet: encefalitt, lymfom og aneurisme/vaskulitt.
- **Posttransplant lymfoproliferativ sykdom**
 - Benign polyklonal B celle proliferasjon-malign lymfom
 - EBV neg resipent som får primær EBV fra pos donor

EBV infeksjon og malignitet

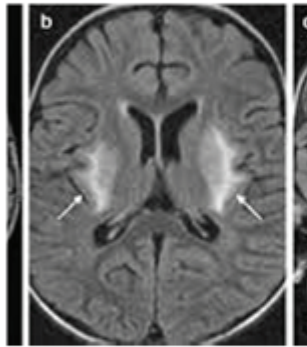


- **Burkitt lymfom**
 - Vanligste malignitet hos barn i Afrika (> 95% EBV smittet før 3 år).
 - Klonal ekspansjon fra enkel EBV-infisert B-celle (CD20+)
 - Malaria og EBV er ko-faktorer i patogenesen ved Burkitt lymfom.
- **Hodgkin lymphom**
 - Reed-Sternberg celler (ca 50% EBV genom) uavhengig av geografisk opprinnelse.
- **Nasopharyngealt carcinom**
 - Sjelden, vanlig i sør-Kina (55: 100.000, EBV genom i alle anaplastiske celler).
- **T cell lymfom**
 - EBV latente gen i maligne celler (EBNA-1, LMP-1, LMP-2) .
 - Fulminant fatal form i forbindelse med akutt EBV .

Malignitet: EBV og HIV infeksjon

- Antall EBV-infiserte celler er høyere hos HIV positive.
- Non-Hodgkin lymfom: x 60-100 mer vanlig ved HIV infeksjon
- Lymfom ved HIV: assosiert med EBV infeksjon (66%).
- HIV + barn:
 - leiomyom and leiomyosarcom (EBV kan infisere muskelceller)

Neurologiske syndrom og EBV-infeksjon



- Neurologiske komplik. 2-5%
 - Guillain-Barré syndrom
 - Fascialis parese
 - Optisk nevritt
 - Meningoencephalitt
 - Aseptisk meningitt
 - Transvers myelitt
 - Perifer nevritt
 - Myelitt/ Polyradiculitt

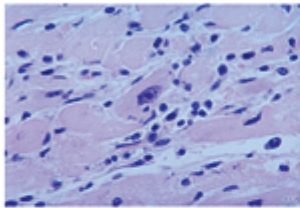
Immunocompetent pt with EBV encephalitt: T2 image dem; inflammatory response confined to the brain microcirculation. corticosteroid and acyclovir (3 weeks): signal intensities normal and patient clinical recovery.
Conclusion: EBV diffuse/reversible brain white matter implication in severe mononucleosis.

Kasustikk: Guillain-Barré syndrome

- 20 år gammel kvinne
- En uke med faryngitt, muskelsmerter, feber ca 38° C.
- 3 dagers sykehistorie med svakhet i u. exr. En dag svakhet o. extr.
- Neurologisk us: pareser, fraværende dype senerereflekser.

- **Spinalvæske:** økt protein 80 mg/dL (15-45 mg/dL), celler 10/mm³, normal glukose 52 mg/dL (40-70 mg/dL).
- CNS og nerveledningstester forenlig med GBS
- **Blodprøver** ALP 96 IU/L (5-35 IU/L), ALAT 104 IU/L (0-55 IU/L).
- **Serologi:** HIV, VDRL, CMV, HSV, HBA, HBV, HCV, Borrelia, neg.
- **VCA-IgM/ VCA IgG pos.** Anti EBNA IgM negativ, Anti EAD IgG pos.
- Immunoglobulin, methylprednisolon og acyclovir 750 mg x 3
- Pareser gikk tilbake 5 dager etter im. glob.

Braz J Infect Dis. 2010 Mar-Apr;14(2):211-2. A rare clinical presentation of Epstein-Barr virus. Onzel C.



Myocarditt

- Hjerte komplikasjoner til EBV infeksjon kjent de siste 60 år.

- Endomyocardial biopsi
 - Immunohistokjemi.
 - Real-time PCR, RT-PCR
- Hjerte autoantistoff (myosin) i perifert blod
- Unge voksne < 35 år: Parvovirus B19 (37%), Coxsackie B virus (33%), HHV-6 (11%), adenovirus (8%)
- Utfordring: skille aktiv viral infeksjon fra latent infeksjon

Viral etiologi ved myocarditt

Table 2 Prevalence of viral infections detected by molecular biology-based techniques in the cardiac tissues of patients with active myocarditis or dilated cardiomyopathy.

Human cardiotropic viruses	Active myocarditis (%)	Dilated cardiomyopathy (%)	References
Coxsackie virus type B	14–32.6	8–35	[17, 19, 27, 30, 31]
Parvovirus B19	< 1–36.6	51.4	[19, 27]
Human herpesvirus 6	10.5	21.6	[19, 27]
Adenovirus	8.1–23	1.6–12	[19, 26, 27]
Multiple infections (60% of cases = parvovirus B19 + human herpesvirus 6)	12.2	27	[19, 27]
Rare viral causes (non-restrictive list) ^a			
Cytomegalovirus ^a	3	0.8	[19, 27]
Epstein-Barr virus ^a	< 1	2	[19, 27]
Herpes simplex virus ^a	< 1	NA	[19, 27]
Influenza viruses	< 1–2	NA	[19, 27]

NA: not available.

^a Except in cases of cardiac transplantation.

REVIEW: Andréoletti L et al. Viral causes of human myocarditis. *Archives of Cardiovascular Disease* (2009) 102, 559–568

Kasustikk: myopericarditt

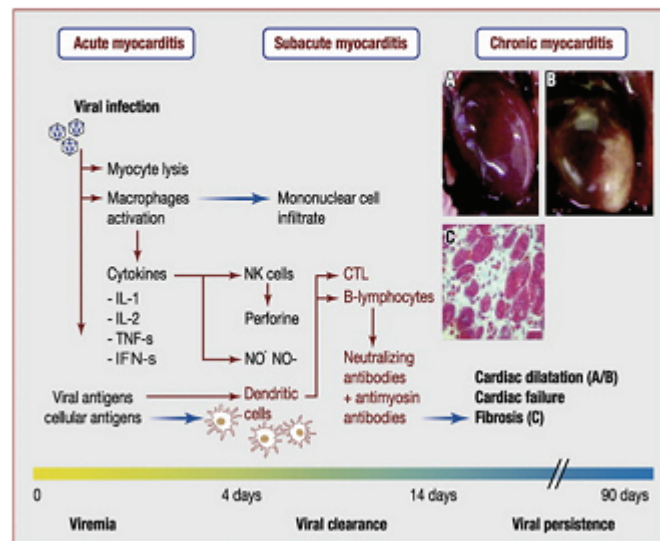
- 20 år gammel tidligere frisk mann med primær EBV infeksjon
- EKG: ST-elevasjon inf lat.
- EKKO: minimal pericardvæske og fortykning –utskrevet
- Reinnlagt etter 4 dager pga høy feber (39.5°C), diffuse muskel/ledd smerter og kraftig makulopapulært utslett, ingen faryngitt/tonsillitt, cervical lymfadenopati, lett hepatosplenomegali.
- **Blodprøver:** mild leukocytose (9,8 cells/μL) med lymfocytose (39.4%) og monocytose (10.3%), normal Hb, Tpk og koagulasjonsprøver, lett økt CRP med normal SR. Lett økte serum transaminaser og gamma-GT. Normal CK

Myopericarditis during a primary Epstein-Barr virus infection in an otherwise healthy young adult. An unusual and insidious complication. Case report and a 60-year literature review. Sabbatani S et al. *Infez Med.* 2012 Jun;20(2):75-81.

Kasustikk: myopericarditt

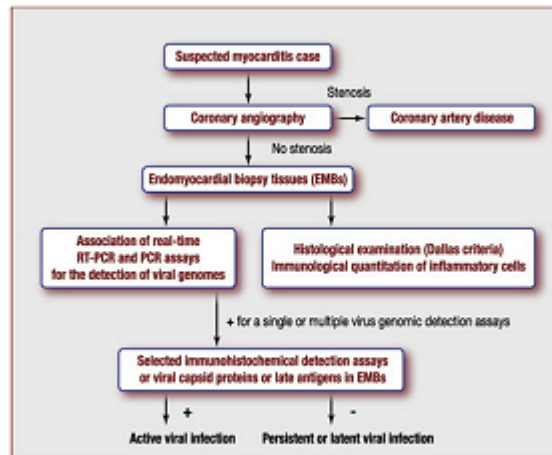
- **Serologi: anti-EBV IgM antistoff pos og begynnende IgG respons**
- Blodkultur, Widal, anti-adenovirus, , CMV, Parvovirus B19 neg.
- Ultralyd: mild hepatosplenomegali.
- Utskrevet etter 7 dager med normalisering av blodprøver bortsett fra lett forhøyede levertansaminaser.
- EKKO cor etter 14 dager: ingen pericardvæske, normal kontraktilitet.
- Fortsatt frisk ved videre oppfølging

Myopericarditis during a primary Epstein-Barr virus infection in an otherwise healthy young adult. An unusual and insidious complication. Case report and a 60-year literature review. Sabbatani S et al. *Infect Med.* 2012 Jun;20(2):75-81.



REVIEW: Andrioletti L et al. Viral causes of human myocarditis. *Archives of Cardiovascular Disease* (2009) 102, 559–568

Diagnostikk av mycarditt: hjertebiopsi: komb av histologi, ICH og PCR (enteroviruses, herpesviruses, parvovirus B19, adenoviruses)



REVIEW: Andreoletti L et al. Viral causes of human myocarditis. Archives of Cardiovascular Disease (2009) 102, 559–568

Konklusjon EBV infeksjon

- 95% av EBV infeksjon forløper ukomplisert.
- 5% av tilfellene komplikasjoner
 - Flere organsystem kan affiseres ved akutt sykdom
 - Alvorlig og fatal ved sjeldne genetiske tilstander
 - Risiko for utvikling av malignitet
- Diagnostikk: komb av serologi, histologi/ICH og PCR.

Deltakere på Strategimøte 1.11.2012

Foredragsholdere og møteledere:	
Heivi Holm Samdal	Ullevål Universitetssykehus
Susanne Gjeruldsen Dudman	Folkehelseinstituttet
Andreas Christensen	St. Olavs hospital
Marianne Thulin Wilhelmsen	Helse-Bergen
Sølvi Noraas	Sørlandet sykehus - Kristiansand
Andreas Emmert	Unilabs
Ellen Holter	Rikshospitalet
Svein Arne Nordbø	St. Olavs hospital
Signe Spetalen	Oslo Universitetssykehus
Birgitta Åsjø	Haukeland Universitetssykehus
Anne Ma Dyrhol Riise	Universitetet i Oslo
Øvrige deltakere	
Bjørn Odd Johnsen	Akershus iniversitetssykehus
Veselka Petrova Dimova-Svetoslavova	Akershus iniversitetssykehus
Inger Sofie Samdal Vik	Folkehelseinstituttet
Ingeborg Aaberge	Folkehelseinstituttet
Susanne Dudman	Folkehelseinstituttet
Gunnar Hoddevik	Folkehelseinstituttet
Hanne Nøkleby	Folkehelseinstituttet
Joakim Øverbø	Folkehelseinstituttet
Trygve Tjade	Fürst medisinske laboratorium
Synnøve Ljones	Fürst medisinske laboratorium
Reidar Hjetland	Førde Sentralsjukehus
Liv Jorunn Sønstebø	Haugesund sjukehus Fonna
Malgorzata Richter	Haugesund sjukehus Fonna
Gro Njølstad	Haukeland Universitetssykehus
Peter A. Chango	Lab1
Silje Alm Lerstad	Molde sjukehus
Alexa Stutzer	Molde sjukehus
Liisa Mortensen	Nordlandssykehuset
Marius Trøsheim	Rikshospitalet
Elisebet Haarr	Stavanger Universitetssykehus
Monica Regin Romstad	Stavanger Universitetssykehus
Roar Bævre-Jensen	Sykehuset Asker og Bærum
Carina Thilesen	Sykehuset Buskerud, Drammen
Viggo Hasseltvedt	Sykehuset Innlandet, Lillehammer
Yngvar Tveten	Sykehuset Telemark
Nils Grude	Sykehuset Vestfold
Anita Kanestrøm	Sykehuset Østfold, Fredrikstad
Unn Houge	Ullevål Universitetssykehus
Gunnar Størvold	Ullevål Universitetssykehus
Dedi Lumnije	Ullevål Universitetssykehus
Dag Hvidsten	Universitetssykehuset Nord-Norge
Garth Daryl Tylden	Universitetssykehuset Nord-Norge

Utgitt av Nasjonalt folkehelseinstitutt
Divisjon for smittevern
Juni 2013

Bestilling:
Nasjonalt folkehelseinstitutt
Postboks 4404 Nydalen
0403 Oslo
Telefon: 21 07 82 00
Telefaks: 21 07 81 05

ISBN 978-82-8082-579-7 trykt utgave
ISBN 978-82-8082-580-3 elektronisk utgave