

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

Освітній ступінь — магістр

на тему: **«ЕПШТЕЙН-БАРР ВІРУСНА ПЕРСИСТЕНЦІЯ
В ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ ОСІБ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Спеціальності 091 Біологія

Сазонтова Анастасія Олегівна

Керівники:

Талько В.В.
доктор медичних наук, професор

Руссу І.З.
кандидат біологічних наук, доцент

Рецензент

Магістерська робота захищена
з оцінкою _____

Секретар ЕК Пахаренко М. В.
« ____ » _____ 2023 р.

Київ – 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Етіологія вірусу Епштейна-Барр.....	8
1.2. Історія вивчення вірусу Епштейна-Барр	10
1.3. Механізми зараження ВЕБ та розвиток інфекційного процесу.....	11
1.4. Захворювання, які провокує вірус Епштейна-Барр	15
1.4.1. Інфекційний моноклеоз	16
1.4.2. Лімфома Беркітта	20
1.4.3. Назофарингіальна карцинома	21
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	25
2.1. Об'єкт дослідження.....	25
2.2. Методи діагностики ВЕБ-інфекції	25
2.2.1. Серологічні методи дослідження.....	25
2.2.2. Полімеразна ланцюгова реакція	27
2.3. Імуноферментне визначення антитіл класу IgG до антигенів ВЕБ.....	29
2.3.1. Принцип аналізу	29
2.3.2. Обладнання та матеріали, необхідні для роботи.....	29
2.3.3. Застереження та техніка безпеки	31
2.3.4. Рекомендації щодо забору, транспортування та зберігання зразків	33
2.3.5. Проведення ІФА для виявлення антитіл до антигенів ВЕБ	33
2.3.6. Облік результатів та їх інтерпретація.....	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	38
3.1. Загальна ВЕБ-персистенція обстежених контингентів (2018-2022рр.)	38
3.2. ВЕБ-позитивні контингенти до антигенів вірусу Епштейна-Барр.....	40

3.3. Співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками інфекційних захворювань	41
3.4. Міксти (змішані інфекції) з вірусом Епштейн-Барр.....	42
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	45
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕБ – вірус Епштейна-Барр

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГНН – гостра ниркова недостатність

ГФС – гемофагоцитарний синдром

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІМ – інфекційний мононуклеоз

ІФА – імуноферментний аналіз

ЛБ – лімфома Беркітта

ЛКІ – лабораторія клінічної імунології

ННЦРМ – Національний науковий центр радіаційної медицини

НФК – назофарингіальна карцинома

ОГ – оптична густина

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПХТ – поліхіміотерапія

СГЛ – синдром гострого лізису

ТМБ – тетраметилбензидин

ЦНС – центральна нервова система

ЕАД – дифузний антиген

ЕАР – локалізований антиген

ЕВНА – ядерний антиген

МА – мембранний антиген

VCA – капсидний антиген

Х-ЛПС – Х-зв'язаний лімфопроліферативний синдром

ВСТУП

Щомиті людину оточує велика кількість різноманітних форм бактерій та вірусів, і більшість людей усвідомлює цей контакт. З деякими із них проживаємо впродовж усього свого життя.

Впродовж останніх 10 років в світі набагато збільшилася інфікованість вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ). Наразі в деяких регіонах вона може коливатись від 90 до 100 % [16, 13, 4]. В Україні ця інфекція є найпоширенішою герпесвірусною інфекцією. За рахунок епідеміологічних досліджень доведено, що близько 90 % людей інфікуються цим вірусом у неповнолітньому віці. Згідно зі статистикою, майже дві третини дітей і майже всі дорослі (близько 98 %) вже зараз заражені цим вірусом, що можна легко пояснити шляхами його передачі, такими як кашель, поцілунки, використання предметів побуту, перенесення через кров або від матері до дитини під час вагітності. У країнах, які є не досить розвинутими, та в соціально несприятливих родинх в основному діти інфікуються у віці до 3 років, а все населення – до повноліття [15]. Набагато пізніше може відбуватися інфікування ВЕБ у більш розвинутих країнах [13, 24].

Контагіозність інфекції, спричиненої ВЕБ, є помірною. Найвірогідніше, це пов'язано з тим, що концентрація вірусу в слині є досить низькою. Інфекція має здатність поширюватись за рахунок того, що хворі та здорові люди спільно користуються посудом чи білизною. Чинники, які знижують загальний та місцевий імунітет, теж можуть сприяти активації інфекції [50].

У результаті того, що дуже часто будь-які симптоми інфекції відсутні, вірус дуже складно діагностувати, і в цьому полягає його небезпека. У деяких випадках люди можуть протягом всього життя і не підозрювати про наявність у них ВЕБ. Однак, слід приділяти особливу увагу діагностиці, оскільки захворювання провокує ураження різних тканин і систем органів.

Згідно з даними, які представила ВООЗ, ВЕБ-інфікованими є майже 90 % дорослого населення планети. Первинне інфікування призводить до

того, що збудник довічно зберігається в організмі, проте періодично можлива реактивація. ВЕБ відіграє велику роль не лише в інфекційній патології, а також і в неврологічній, імунологічній, ревматологічній, онкологічній, гематологічній та імунологічній. Зростання захворюваності на ВЕБ-інфекцію в останні роки, ймовірно, пов'язано не лише з епідеміологічним підйомом, а й з тим, що покращились методи діагностики [8].

У лабораторній діагностиці ВЕБ-інфекції застосовують полімеразну ланцюгову реакцію та серологічні методи дослідження. До серологічних методів належать тест на виявлення гетерофільних антитіл та використання імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення специфічних антитіл. Останній метод дозволяє не лише встановити той факт, що інфікування ВЕБ наявне, а також визначити стадію чи форму захворювання.

Мета роботи. Оцінка поширеності персистенції вірусів Епштейна-Барр серед репрезентативного масиву імунокомпетентних контингентів, обстежених у лабораторії клінічної імунології та ізосерології ННЦРМ.

Завдання роботи:

1. Визначити параметри, які характеризують Епштейн-Барр вірусну персистенцію в імунокомпетентних осіб.
2. Оцінити ефективність застосування методики імуноферментного аналізу для визначення специфічних антитіл до різних антигенів вірусу Епштейна-Барр та інших персистуючих інфекцій, а також для встановлення фаз інфекційного процесу.
3. Провести ретроспективну оцінку інфікованості вірусами Епштейна-Барр контингентів, обстежених в лабораторії клінічної імунології та ізосерології у відділі клінічної імунології на базі ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України» у 2018-2022 рр.

4. Проаналізувати показники співіснування вірусу Епштейна-Барр в імунокомпетентних осіб із цитомегаловірусом, вірусом простого герпесу та токсоплазмозом, також визначити частоту мікст-інфекцій.

Об'єкт наукового дослідження – Епштейн-Барр вірусна персистенція в імунокомпетентних осіб.

Предмет наукового дослідження – оцінка поширеності Епштейн-Барр вірусної інфекції в імунокомпетентних осіб.

Роботу виконано на базі лабораторії клінічної імунології та ізосерології у відділі клінічної імунології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України».

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія вірусу Епштейна-Барр

Вірус Епштейна-Барр (ВЕБ) – це великий оболонковий вірус, який ще відомий як вірус герпесу людини 4-го типу. Його геном складається з дволанцюгової ДНК, а реплікація вірусу відбувається в ядрі інфікованих клітин. Етіологічна роль ВЕБ відома при таких захворюваннях, як інфекційний мононуклеоз (ІМ), лімфома Беркітта, назофарингеальна карцинома, лімфопроліферативний синдром, пов'язаний з Х-хромосомою, і синдром хронічної втоми [22].

Оскільки ВЕБ належить до родини герпесвірусів, то має сфероїдну форму і оточений подвійною ліпопротеїновою мембраною (перикапсидом). Усередині у білковому капсиді міститься ядро. Капсид складається з однакових білкових структур – капсомерів, що формують ікосаедр, який складається з 150 екзонів та 12 інтронів. Капсид охоплює геном, який складається з лінійної дволанцюгової молекули ДНК у 172 кілобази. Геном характеризується наявністю декількох повторних послідовностей, одні локалізовані, інші у вигляді дисперсних повторів, які розподілені по всьому геному і можуть бути присутні в кількох копіях. Він кодує близько ста генів.

На поверхні суперкапсиду знаходяться глікопротеїнові молекули (глікопротеїнові шипи). Серед них найважливішими є gp350, gp85, gp25, gp42 [2].

У ВЕБ виділяють декілька специфічних антигенів, таких як капсидний антиген (VCA), ядерний антиген (EBNA), ранні антигени (дифузний EAD та локалізований EAR) та мембранний антиген (MA), які мають різний час появи та біологічне значення. Якщо знати час появи цих антигенів та виявити до них антитіла, то можна з високою точністю діагностувати гостру, латентну та хронічну ВЕБ-інфекцію. Якщо спочатку з'являються антитіла до ранніх

антигенів, а потім до ядерного антигену, то це свідчить про гостру інфекцію. А відсутність антитіл до ранніх антигенів, але наявність до капсидного та мембранного антигенів, свідчить про латентну інфекцію, яка сталася раніше [13].

Є ряд захворювань, асоційованих із ВЕБ, при яких спектр антитіл дуже відрізняється. До таких відносять ІМ, лімфому Беркїтта, назофарингеальну карциному. Хворі на ІМ мають антитіла різних класів імуноглобулінів, які належать до різних вірус-специфічних антигенів. Люди з лімфомою Беркїтта мають підвищені титри IgG-антитіл до EAR, тоді як пацієнти з назофарингеальною карциномою мають підвищені титри IgA-антитіл до EAD і VCA. Розмір пухлини пов'язаний з титрами антитіл, і при успішному лікуванні титри антитіл знижуються [7, 12].

У більшості випадків ВЕБ не має ніяких проявів, проте при ослабленні імунної системи людини він здатен активізуватися та в подальшому призвести до онкологічних захворювань, або ж викликати гострий мононуклеоз.

Даний вірус є досить поширеним на усій земній поверхні і досить незвичайним є той факт, що саме його можна було виділити навіть в окремих національних групах людей. Проводячи молекулярний аналіз штамів ВЕБ, які були виділені у пацієнтів з різноманітними клінічними формами ВЕБ-інфекції, що проживали на різних географічних територіях, було виявлено тільки один тип ВЕБ. Усі інші різновиди, які можна спостерігати у його геномі, досить великого значення не мають та не змінюють його ознак [2].

У дитячому віці, у більшості випадків, інфікування ВЕБ є безсимптомним. У розвинених країнах спостерігається зараження у підлітковому чи ранньому дорослому віці, що часто проявляється у формі клінічного ІМ. Симптоми ІМ можуть змінюватися від незначної лихоманки до тривалої виснажливої хвороби. Загалом у період від 2 до 4 тижнів симптоми зникають, проте у більше ніж 90 % осіб прогресує прихована інфекція в В-лімфоцитах. У близько 1 % людей, які мають певну імунну

схильність, можуть розвиватися тяжчі ускладнення (гепатит, міокардит, розрив селезінки, неврологічні ускладнення). У індивідів, які мають ослаблений імунітет, первинна ВЕБ-інфекція призводить до таких тяжких розладів, як лімфома Беркітта [13, 17].

1.2. Історія вивчення вірусу Епштейна-Барр

Серед усіх клінічних форм інфекції, причиною якої є ВЕБ, найпершим було описано ІМ. Це відкриття належить російському лікарю, який є засновником педіатрії, Нілу Федоровичу Філатову. Він зробив це у 1884 р. та означив захворювання як «ідіопатичне запалення лімфатичних залоз». Також встановив заразність характеру захворювання у дітей. [23]

У 1889 р. німецький педіатр Еміль Пфейффер описав спалах цієї інфекції, яка пізніше була названа «гарячкою Пфейффера». Порівняно з лікарем Філатовим він навів значно більше клінічних проявів хвороби у своїй роботі. Офіційну назву «інфекційний моноклеоз» хвороба отримала у 1920 р., проте остаточно це було затверджено на Міжнародному з'їзді інфекціоністів, який відбувся лише в 1961 р. [53].

Сам вірус Епштейна-Барр вперше виділили британські вірусологи Ентоні Епштейн та Івон Барр із клітин злоякісної лімфоми Беркітта [29]. Науковці описали вірус у 1964 р., проаналізувавши культури клітин, взяті у пацієнтів з Африки, у яких спостерігалось ураження певною лімфомою, що вражає субсахарські райони малярії. Дані зразки були взяті науковцем Дені Парсонсом Беркіттом, який у 1958 р. виявив та описав цю хворобу, а також проаналізував її епідеміологію [22]. Виділивши клітинну лінію та проаналізувавши клітини під електронним мікроскопом, Епштейн та Барр підтвердили наявність цього нового вірусу герпесу, який на їх честь назвали вірусом Епштейна-Барр. Тому вірус, що вважався спочатку відповідальним за лімфому Беркітта, був згодом знайдений майже у всіх дорослих людей, і його роль у патогенезі африканської лімфоми була поставлена під сумнів.

Взаємозв'язок між ВЕБ та ІМ було виявлено у 1968 р. після того, як один із працівників, будучи серонегативним, захворів на ІМ та набув ВЕБ-антитіла [5, 6, 14, 17]. Через певний час виявили, що ВЕБ, крім ІМ, спричиняє виникнення цілої низки інших захворювань. Усі ці хвороби об'єднує неконтрольоване збільшення кількості ВЕБ-інфікованих В-лімфоцитів на тлі порушеного імунологічного розпізнавання ВЕБ-зв'язаних антигенів [38, 39, 50].

1.3 Механізми зараження ВЕБ та розвиток інфекційного процесу

ВЕБ передається повітряно-крапельним шляхом через інфіковану слину, часто через поцілунок. Іграшки, забруднені слиною хворого або вірусоносія, також можуть бути джерелом інфекції, особливо для дітей. До можливих шляхів передачі інфекції також відносять гемотрансфузійний та через статеві контакти [41]. Припускають, що розвиток вродженої ВЕБ-інфекції може бути спричинений передачею вірусу від матері до плоду [5, 19, 24]. Контагіозність ВЕБ є помірною, це найімовірніше, пов'язано з тим, що концентрація вірусу в слині є досить низькою. Однак, не зважаючи на помірну контагіозність, сприяти поширенню інфекції можуть тісний контакт, спільне використання посуду та постільної білизни. Зниження загального і місцевого імунітету є факторами, які спричиняють активацію латентної інфекції [50].

Первинне інфікування ВЕБ у людей, які не мають дефектів імунної системи, може протікати безсимптомно або викликати субклінічні прояви хвороби з позитивними серологічними реакціями. Після інфікування вірус може перебувати у клітинах хазяїна у вигляді латентної інфекції довгий період часу. До гострих форм захворювання призводить вірусемія, яка розвивається при імунній недостатності або масивному зараженні вірусом.

У клітинах хазяїна ВЕБ притаманна тропність до В-лімфоцитів, він тривалий час зберігається як «латентне» захворювання. Даним вірусом

викликається ІМ. Він також є причиною таких захворювань, як лімфома Беркітта, енцефаліт новонароджених, В-клітинна лімфопроліферація, лімфоїдна інтерстиціальна пневмонія у дітей. Встановлення часу появи різних антигенів та виявлення антитіл до них допомагає більш точно діагностувати фазу ВЕБ-інфекції: гостру, латентну, хронічну ВЕБ-інфекцію та її активацію [49].

При проникненні ВЕБ до організму ураженню піддається епітелій слизових оболонок, зазвичай мигдаликів. Взаємодіючи з клітинами слизового епітелію, ротоглотки та В-лімфоцитами ВЕБ проявляє тропність до них, що в подальшому і призводить до зараження цих клітин. На даний час принцип взаємодії ВЕБ із В-лімфоцитами вивчений найкраще.

Епітеліальні клітини та лімфоцити мають певні відмінності в інфікуванні. В епітеліальних клітинах вірус піддається повній реплікації, утворюючи велику кількість віріонів, спричиняючи лізис епітеліоцитів та вихід віріонів у позаклітинний простір для зараження сусідніх клітин. Під час інфікування В-лімфоцитів, тільки 20 % цих клітин активно продукують вірус, тоді як у решти клітин вірус перебуває у прихованому стані [53].

Також ВЕБ може інфікувати інші типи клітин, такі як Т-лімфоцити, НК-клітини, макрофаги, нейтрофіли та епітеліальні клітини судин, що призводить до розвитку хронічної активної ВЕБ-інфекції, ВЕБ-асоційованого гемофагоцитарного лімфогістіоцитозу та інших захворювань. Для цих захворювань характерною є здатність вірусу перебувати латентно в лімфоцитах, що означає його можливість зберігатись у неактивному стані та повторно активуватись в майбутньому. У ядрі клітини-господаря ДНК ВЕБ може утворювати кільцеву епісомальну структуру або інтегруватися в геном, викликаючи хромосомні аномалії.

На сьогодні немає єдиної думки щодо природи персистенції вірусу в Т-клітинах і НК-клітинах. Деякі автори припускають, що ця взаємодія завжди відбувається на початкових стадіях первинної інфекції ВЕБ і зазвичай є самообмежуючим процесом, оскільки ці клітини виводяться з кровотоку. Інші

дослідники припускають, що цей процес може бути патогенетичним механізмом для розвитку різних захворювань, таких як хронічна активна інфекція ВЕБ та гемофагоцитарний лімфогістіоцитоз, які асоціюються з ВЕБ [24, 50].

При первинній інфекції ВЕБ вірусна ДНК потрапляє в ядро клітин, а В-лімфоцити, які є ВЕБ-інфікованими, починають безперервно розмножуватись у культурі. Такий процес має назву іморталізація (безсмертя) В-лімфоцитів та притаманний для всіх форм ВЕБ-інфекції.

Після того, як ВЕБ зафіксувався на поверхні В-лімфоцитів, відбувається активація Т-лімфоцитів-супресорів, природніх Т-кілерів, а також механізмів антитілозалежного цитолізу за допомогою НК-клітин. Вважається, що при первинній ВЕБ-інфекції кількість Т-лімфоцитів у 40-50 разів більша за кількість В-лімфоцитів. З одного боку, ці механізми призводять до зниження проліферації та диференціювання В-лімфоцитів, а з іншого – сприяють лізису інфікованих В-лімфоцитів, що призводить до вивільнення вірусу у кровотік та його подальшої елімінації за допомогою гуморальної імунної відповіді, зокрема специфічних антитіл. Ці захисні механізми перешкоджають можливості набуття клітинами властивостей злоякісної пухлини [2].

Гемолітична форма вірусної інфекції переважає під час гострої чи активної фази. Проте після інфікування вірус продовжує персистувати в клітинах пам'яті протягом усього життя людини, незалежно від гострої фази. Кількість В-клітин із вірусною ДНК у здорової людини постійна і становить близько 1×10^5 – 1×10^6 . Після первинного інфікування ВЕБ залишається в організмі хазяїна в невеликих кількостях протягом усього життя. Природні кілери та цитотоксичні Т-лімфоцити обмежують первинну інфекцію, контролюючи пул "безсмертних" ВЕБ-інфікованих В-лімфоцитів. Однак, якщо будь-який елемент імунної відповіді пошкоджений, навіть невелика популяція клітин, які були інфіковані ВЕБ, може почати активно розмножуватися, що може призвести до розвитку лімфопроліферативного синдрому та лімфоми при порушенні імунної відповіді. Інша ситуація

виникає, якщо відповідь занадто активна, що може призвести до фатального ІМ або проліферації клітин [40].

Завдяки тому, що у ВЕБ досить великий набір генів, він має здатність уникати імунного контролю організму. Білки, вироблені ВЕБ, є аналогами інтерлейкінів людського організму, які забезпечують зміну імунної відповіді. У процесі розмноження ВЕБ відбувається продукування інтерлейкін-10-подібного білку. Він забезпечує пригнічення Т-клітинного імунітету, негативно впливає на функціонування цитотоксичних лімфоцитів та макрофагів. За його рахунок порушується функціонування системи противірусного захисту, тобто природні кілери втрачають здатність виконувати свої функції в повному обсязі. Вірусний білок (В13) здатен пригнічувати інтерлейкін-12. За рахунок аномальних генетичних перебудов може виникати неправильна імунна відповідь до вірусу. В подальшому це може призвести до розвитку злоякісних пухлин [40].

Деякі люди, яким притаманна Х-зв'язана генетична схильність, втрачають здатність нормально реагувати на ВЕБ. На Х-хромосомі присутній ген, який є маркером лімфопроліферативного синдрому. Хворі пацієнти з Х-зв'язаним лімфопроліферативним синдромом (Х-ЛПС) можуть мати різні прояви ВЕБ-інфекції. У 75 % випадків виникає злоякісна лімфома Беркітта або фатальний ІМ. Причиною смерті таких пацієнтів є в основному некроз печінки, який виникає за рахунок лімфоїдної інфільтрації цього органу. Ознаки гемофагоцитарного синдрому (ГФС) проявляються у великій кількості пацієнтів. У 25 % хворих після перенесення первинної ВЕБ-інфекції діагностують проліферативну хворобу. Ця хвороба може проявлятися апластичною анемією, агранулоцитозом або гіпогаммаглобулінемією. Такі хворі є більш чутливими до інфекцій бактеріального характеру [5, 50].

Більшість пацієнтів, що страждають від Х-ЛПС, мають нормальну імунну відповідь на звичайні щеплення та вірусні й бактеріальні інфекції, які вони перенесли в дитинстві. Дослідження, проведені у ВЕБ-серонегативних осіб, які мешкають в інфікованій вірусом родині, виявили, що кількість Т- та

В-клітин у них є нормальною. Однак низький рівень IgG і підвищені титри IgA та IgM спостерігають при гострому ІМ. У разі гострої ВЕБ-інфекції у хворих з Х-ЛПС спостерігається зниження функції Т-клітин та природних кілерів, а також недостатня кількість антитіл до ВЕБ, що ускладнює регулювання первинної інфекції.

Особливу увагу слід приділити лімфопроліферативним порушенням, які виникають після трансплантації у пацієнтів, що отримали трансплантати нирок, серця, печінки або кісткового мозку. Ці пацієнти мають ризик розвитку ІМ-подібної хвороби або виникнення локалізованої пухлини впродовж першого року після операції. Можлива також поява хвороб, які мають симптоми, подібні до ІМ, проте при морфологічному дослідженні виявляють злоякісні ознаки. Локалізовані пухлини часто проявляються як неходжкінська лімфома. Також можуть спостерігатись ураження центральної нервової системи (ЦНС). Загалом усі випадки лімфопроліферативних порушень після трансплантації спричинені В-клітинами. Проведений аналіз ділянок ушкодженої тканини засвідчив про моно- та поліклональну проліферацію В-клітин. Наявність первинної або реактивованої ВЕБ-інфекції в більшості пацієнтів підтверджується виявленням ВЕБ-геному та його антигенів, що свідчить про їх роль у розвитку цих порушень [2].

1.4. Захворювання, які провокує вірус Епштейна-Барр

Більше 90 % населення земної кулі є здоровими носіями ВЕБ. Первинна ВЕБ-інфекція може бути безсимптомною у дітей, проте патологічною у підлітків та дорослих, що може привести до серйозних захворювань. У результаті досліджень, з використанням методики напівкількісної ПЛР, виявили, що кількість заражених В-лімфоцитів є сталою протягом життя здорової людини та становить одну клітину на мільйон клітин периферійної крові.

Одним із основних захворювань, які провокує ВЕБ, є ІМ. Також ВЕБ може асоціюватись з онкологічними захворюваннями. Зв'язок між різними пухлинами та ВЕБ більш поширений, ніж зв'язок з всіма іншими вірусами людини. Проте у той же час, у більшості носіїв вірус не викликає жодного захворювання. Цей очевидний парадокс приводить до висновку, що це мирне співіснування зумовлене взаємодією імунного нагляду господаря з експресією вірусних білків.

Нещодавно була виявлена сильна асоціація між деякими геномними варіантами ВЕБ та розсіяним склерозом, що посилює думку про те, що ВЕБ сприяє розвитку цієї хвороби [15, 16].

1.4.1. Інфекційний мононуклеоз. ІМ, також відомий як хвороба Філатова, залозиста лихоманка, моноцитарна ангіна або хвороба Пфейфера, є гострим антропонозним вірусним захворюванням, яке передається переважно повітряно-крапельним шляхом. Його спричинює ВЕБ, і в основному воно характеризується інтоксикацією, підвищенням температури тіла, загальною лімфаденопатією, ураженням ротоглотки, гепатоспленомегалією та наявністю атипових мононуклеарів і гетерофільних антитіл у периферійній крові. Це захворювання може мати хронічний перебіг [30].

Вперше це захворювання описав Н. Ф. Філатов у 1885 р., та назвав його «ідіопатичним запаленням шийних залоз». Пізніше, у 1889р., німецький лікар Ріхард Пфейфер (R. Pfeiffer) назвав це захворювання «залозистою лихоманкою». Американські вчені Т. Sprunt та F. Evans в 1920 р. ввели термін "інфекційний мононуклеоз", який був прийнятий всесвітньою громадськістю після проведення Міжнародного з'їзду інфекціоністів у 1961 р. Після відкриття патогену у 1964 р. хворобі було надано нову назву – "інфекція, викликана вірусом Епштейн-Барр", або "Епштейн-Барр вірусна інфекція". Проте на даний момент ця назва не вважається синонімом для терміну "інфекційний мононуклеоз" [10].

Вивченню ІМ свої роботи присвятили учені з колишнього СРСР, такі як І. А. Кассирський, Н. І. Нісевич та Н. М. Чірешкіна. Вони зробили вагомий

внесок у дослідження патогенезу і клінічних ознак ІМ, а також у розробку методів його лікування. ІМ є поширеним захворюванням, яке серед населення загалом складає 50 випадків на 100 000 осіб на рік, а серед осіб у віці 15-25 років цей показник вдвічі вищий. Ризик захворювання на ІМ є високим, зокрема, у країнах з низьким рівнем розвитку, де захворюваність дітей до 3 років може досягати 80 %. Це пояснюється наявністю форм захворювання з легким перебігом і без симптомів, а також зі складнощами в діагностиці інфекції [11].

Не лише поширення ІМ, але і недостатня діагностика з боку лікарів первинної ланки вимагає вивчення особливостей сучасного перебігу цієї хвороби. Дослідження показують, що розбіжності в діагнозах досягають 40 % при направленні пацієнтів до стаціонару. Значний підйом захворюваності на ІМ за останні роки також відзначається багатьма дослідниками, які пов'язують це зі змінами в екології та зниженням імунного статусу людей.

Інфекція ВЕБ може бути передана через хворих, які проявляють симптоми хвороби, такі як стерті і типові форми, або не проявляють жодних симптомів. Крім того, вірус може бути переданий від вірусоносіїв. Виділення ВЕБ зі слиною може тривати від 2 до 18 місяців після захворювання, але деякі дослідники вважають, що виділення вірусу з орофарингеальним секретом можливе протягом усього життя у здорових людей з високим рівнем антитіл. Існує зв'язок між виділенням вірусу в навколишнє середовище та імунною системою [11, 27].

Передача інфекції та її поширення можливі через різні шляхи, включаючи повітряно-крапельний, контактний-побутовий, парентеральний та статевий. Є згадка про вертикальний шлях передачі інфекції та загальну сприйнятливість. ІМ частіше спостерігається як різкі випадки захворювання, але може також спричиняти епідемії в закритих групах, таких як дитячі садки, студентські гуртожитки і військові частини. Хоча контагіозний індекс не встановлено, він вважається низьким через високий рівень імунітету в цих групах людей [9].

Інфекція входить через епітелій ротоглотки та потрапляє в сприйнятливі В-лімфоцити лімфоїдної тканини глотки, що є основним маршрутом зараження. Також можливе проникнення вірусу через шлунково-кишковий тракт. Епітеліальні клітини ротоглотки та В-лімфоцити мають на своїй поверхні рецептори для ВЕБ – молекули CD21. В епітелії слизової оболонки рото- і носоглотки, лімфоїдних утвореннях глотки та протоках слинних залоз, а також в епітелії шийки матки починається первинна реплікація вірусу, що відповідає інкубаційному періоду.

З моменту введення вірусу в організм виникає гіперемія та набряк слизових оболонок порожнини рота та глотки, а також збільшення тканини мигдалин і слизових оболонок носа. Ці симптоми супроводжуються утрудненим носовим диханням та помірною болісністю під час ковтання.

Після інфікування ВЕБ В-лімфоцити набувають здатність до безмежної проліферації, перетворюючись на атипові моноклеари – великі лімфоцити незвичайної форми. Подальше поширення вірусу відбувається через кров і лімфу до периферійних лімфовузлів, печінки та селезінки [9,21].

Патологічний процес у цих органах розпочинається практично одночасно. ВЕБ стимулює як гуморальний, так і клітинний імунітет. Однак, головну роль у придушенні та елімінації інфекції відіграє клітинний імунітет. Після інфікування В-лімфоцитів, CD8 Т-лімфоцити (цитотоксичні Т-лімфоцити і Т-супресори) швидко розмножуються, що призводить до їх активації та вираженої цитотоксичної дії на заражені В-лімфоцити, зупиняючи їх розмноження. Це сприяє збільшенню експресії маркерів активації Т-лімфоцитів та збільшенню концентрації γ -інтерферону в периферійній крові [49].

Існує декілька думок щодо клінічної класифікації ІМ, проте загальноприйнятої не існує. Деякі дослідники виділяють до 20 різних форм хвороби, проте існування багатьох із них ставиться під сумнів (Казанцев А.П., Матковський В.С., 1986). Для практичної роботи можна виділити наступні клінічні форми ІМ: первинна, гостра інфекція, яка може бути

залозистою, грипоподібною, жовтяничною, змішаною та септичною (дисемінованою у хворих з важким імунodefіцитом); вторинна інфекція, яка може проявлятися у вигляді хронічної форми ІМ. Також існують варіанти перебігу ВЕБ-інфекції (табл. 1).

Таблиця 1

Клінічні форми ІМ, викликані ВЕБ

Первинна форма	Вторинна форма
Інфекційний моноклеоз: - типовий; - атиповий; - стертий. Нейроінфекційне ураження.	Пухлини: - лімфома Беркітта; - неходжкінська лімфома; - первинна В-клітинна лімфома ЦНС; інші В-клітинні лімфоми; носоглоткова карцинома; волохата лейкоплакія. Лімфоїдний інтерстиціальний пневмоніт. Нейроінфекційне ураження. Хронічна форма.

Головними проявами ІМ є генералізована лімфоаденопатія, лихоманка, гепатоспленомегалія, тонзиліт, а також висипи (які можуть бути різних форм і алергічного походження) та спостерігаються в 96-97 % випадків. Атипові форми, що становлять 3-4 %, можуть відрізнятися відсутністю основних симптомів або несподіваною вираженістю окремих проявів, а також появою нехарактерних симптомів.

ІМ має різноманітні клінічні прояви, залежно від форми захворювання. Інкубаційний період триває від 4 до 14 днів, а іноді може досягати 50 днів. Зазвичай хвороба починається гостро, супроводжуючись підвищенням

температури тіла, м'язовими і суглобовими болями та головним болем. Також хворих турбують болі в горлі, утруднене носове дихання та збільшення лімфатичних вузлів. Із перших днів розвитку ІМ можна спостерігати помірну лейкопенію та нейтропенію, лімфоцитоз і наявність плазматичних клітин у периферійній крові. Однак характерні зміни в крові можуть проявитися після 5 днів від початку захворювання. Лейкоцитоз може розвиватися до $10-13 \times 10^9/\text{л}$ (іноді може досягати гіперлейкоцитозу до $18-20 \times 10^9/\text{л}$), а також може збільшуватися кількість лімфоцитів та плазматичних клітин. Крім того, можуть з'являтися атипові монолімфоцити (10-60 % і більше) [53].

Час одужання може становити від 2 до 4 тижнів. Проте, у деяких випадках можуть залишатися такі симптоми, як гепатоспленомегалія та наявність атипових мононуклеарів, що свідчить про тривалий перебіг ІМ. Під час аналізу катамнезу виявлено, що в перші три місяці після захворювання тільки одна третина пацієнтів досягла клінічного одужання, тоді як 20 % хворих мали затяжний перебіг із рецидивами. Також, у 25 % пацієнтів спостерігалися часті захворювання на ГРЗ та бактеріальні інфекції, такі як отити та синусити.

У хворих з імунodefіцитом можуть спостерігатися ускладнення ІМ різного характеру, включаючи гематологічні, кардіологічні та неврологічні. Серед гематологічних ускладнень можуть бути аутоімунна гемолітична анемія, тромбоцитопенія, гранулоцитопенія, а також розрив селезінки. Кардіологічні ускладнення можуть включати перикардит та міокардит, а неврологічні – менінгіт, менінгоенцефаліт, мієліт та нейропатії [1].

1.4.2. Лімфома Беркітта. Лімфома Беркітта (ЛБ) є високо агресивною лімфомою, що розвивається з імунологічно зрілих В-клітин з переважно екстранодальною локалізацією. Вона зазвичай виникає внаслідок цитопатичного впливу ВЕБ на лімфоїдні клітини. Якщо не лікувати, ЛБ швидко прогресує і може призвести до смерті [45].

ЛБ є одним із типів лімфом неходжкінського походження. У дітей вона становить значну частку всіх лімфом, зокрема близько 30-50 %, тоді як у

дорослих цей відсоток знижується до 2 %. За статистикою, серед дітей хлопчики хворіють на ЛБ частіше, ніж дівчатка, співвідношення становить 3-4:1, середній вік – 8 років. У дорослих переважно хворіють молоді чоловіки, співвідношення між чоловіками і жінками – 3:1, середній вік – 25-30 років [56].

ЛБ характеризується дифузним ростом клітин середнього розміру з округлими ядрами та вузьким обідком базофільної цитоплазми, що мають мономорфний характер. Вона відноситься до В-клітинних лімфом. Діагноз ЛБ вимагає обов'язкового проведення цитогенетичного / FISH дослідження для виявлення транслокації $t(14;18)(q32;q21)$ / IgH, і виключення реаранжировки BCL-2, BCL-6.

ЛБ характеризується переважно екстранодальною локалізацією пухлини. Органи черевної порожнини, такі як тонка кишка (зокрема, термінальний відділ), брижа, шлунок, товста кишка, очеревина, печінка і селезінка, найбільш часто зазнають ураження. Крім того, у 25-35% випадків може бути уражений кістковий мозок, а центральна нервова система – у 20-25% випадків. Ріст пухлини є швидким, і до госпіталізації ураження органів черевної порожнини можуть бути представлені масивним пухлинним конгломератом із пошкодженням кількох внутрішніх органів. ЛБ є одним з найшвидше зростаючих злоякісних новоутворень і характеризується високою чутливістю до хіміотерапії. У 80-90 % випадків вдається досягти тривалих клініко-гематологічних та цитогенетичних ремісій за допомогою інтенсивної високодозової поліхіміотерапії (ПХТ). Однак, терапія рецидивів залишається викликом і є невирішеною проблемою [44, 57].

1.4.3. Назофарингіальна карцинома. Назофарингіальна карцинома, відома як рак носоглотки, є злоякісним утворенням, що з'являється у верхній частині глотки. Вона відрізняється від інших типів пухлин голови та шиї з точки зору свого розвитку, причин виникнення, клінічного перебігу та методів лікування [28].

Рак носоглотки може бути класифікований на різні гістологічні підтипи, включаючи ороговіваючу плоскоклітинну карциному та незроговілу плоскоклітинну карциному. За даними ВООЗ, більш як 95 % випадків ендемічної назофарингеальної карциноми відносяться до недиференційованого III типу, який пов'язаний із хронічною ВЕБ-інфекцією. Це стає потужним етіологічним фактором разом із генетичною сприйнятливістю та вживанням консервованої їжі.

ВЕБ має важливе значення у розвитку раку носоглотки. Хворі на назофарингеальну карциному мають вищі титри ВЕБ-антитіл порівняно з контрольною групою, що свідчить про його вплив на розвиток захворювання. Крім того, повний геном ВЕБ був знайдений у ядрах практично всіх злоякісних клітин у пухлинах носоглотки, що додатково підтверджує його роль у формуванні хвороби [26].

Щоб виявити назофарингеальну карциному, широко використовуються титри IgA антитіл до антигену капсиду ВЕБ (IgA VCA) і раннього антигену (IgA EA) як скринінгові та діагностичні маркери, але вони не мають достатньої специфічності. Крім того, рівень цих антитіл може залишатися підвищеним, навіть у стадії ремісії. У протилежність до IgA VCA та IgA EA, оцінка кількості ДНК ВЕБ за допомогою ПЛР у реальному часі є методом з високою чутливістю та специфічністю і добре корелює зі ступенем тяжкості захворювання. Рівень ДНК ВЕБ у плазмі крові перед початком лікування може ефективно доповнити стадіювання за системою TNM, а підвищений рівень цієї ДНК через 6 тижнів після лікування може слугувати потужним прогностичним фактором рецидиву та виживання. У клінічній практиці, вимірювання рівня ДНК ВЕБ використовується для моніторингу клінічної відповіді на лікування. Однак, останні дослідження показують важливість цього маркера як скринінгового інструменту для оцінки ризику резистентності до терапії [26, 58].

Рак найчастіше починається з бічної стінки носоглотки – діафрагми Розенмюллера, яка є щілиноподібним простором за глотковим виходом

евстахієвої трубки або в області навколо її виходу. Однак це захворювання може також розвиватися на верхній стінці носоглотки або стопі горла. Рак носоглотки може спричиняти руйнування кісток (остеоліз), що сприяє його поширенню до сусідніх анатомічних зон [42].

Метастазування в раку носоглотки є досить поширеним явищем, при цьому лімфатичні вузли є найбільш частим місцем ураження. Першими зазвичай постраждають лімфатичні вузли ретрофарингіального простору, а потім – ті, що знаходяться у горлі. Задньоглоткові лімфатичні вузли зазвичай уражуються у 65 % випадків. Звідти метастази поширюються через лімфатичні судини до глибоких вузлів ший.

Висока радіочутливість назофарингіальної карциноми робить променеву терапію основним методом лікування цієї пухлини. У випадках, коли спостерігається збільшення лімфатичних вузлів ший, а також при відсутності віддалених метастазів, показана радикальна операція лімфатичної системи ший з використанням методу Явдинського-Крила. Іншим методом лікування для області ший може бути селективна променева терапія [58].

Узагальнюючи огляд, можна стверджувати, що тема Епштейн-Барр вірусної персистенції в імунокомпетентних осіб залишається актуальною з кількох причин.

По-перше, Вірус Епштейн-Барр (ВЕБ) є одним із найпоширеніших вірусів людини: він інфікує близько 90 % світової популяції. Багато людей стають носіями ВЕБ-інфекції, але у більшості випадків це не спричиняє серйозних проблем. Проте, у деяких людей ВЕБ може викликати хронічну інфекцію, яка може мати довготривалі наслідки для здоров'я.

По-друге, ВЕБ пов'язаний із різними захворюваннями, які можуть призвести до більш серйозних ускладнень, таких як синдром хронічної втоми, лімфопроліферативні захворювання (наприклад, лімфома Беркітта), аутоімунні захворювання і навіть деякі види раку. Дослідження варто продовжувати, щоб краще зрозуміти зв'язок між ВЕБ і цими захворюваннями, а також розробити нові методи діагностики та лікування.

По-третє, для багатьох людей, у яких проявляються хронічні симптоми, пов'язані з ВЕБ, правильна постановка діагнозу може зайняти тривалий час. Симптоми ВЕБ можуть бути неспецифічними і дуже схожими на інші захворювання, у результаті чого їх важко визначити. Покращення діагностичних методів забезпечить ранню діагностику.

По-четверте, розуміння механізмів персистенції ВЕБ в імунокомпетентних осіб є дуже важливим для розробки ефективних стратегій лікування. ВЕБ може залишатися в організмі у прихованій формі, має здатність реактивуватися у відповідь на певні фактори, такі як стрес або інші інфекції. Розуміння того, як вірус уникає імунної відповіді і підтримує свою персистенцію, може привести до розробки нових ліків або вакцин, спрямованих на контроль або знищення вірусу.

По-п'яте, ВЕБ має значний вплив на клітини та молекули імунної системи, зокрема, В- і Т-лімфоцити, а також на продукцію ними цитокінів та антитіл. Це може призводити до порушення балансу імунної системи і сприяти розвитку запальних реакцій, аутоімунних захворювань або збільшенню вразливості до інших інфекцій. Дослідження механізмів взаємодії ВЕБ з імунною системою дозволить розробити нові підходи у лікуванні цих ускладнень.

Отже, персистуюча ВЕБ-інфекція має важливі наслідки для громадського здоров'я. Зважаючи на високу її поширеність, важливо розробити стратегії профілактики, діагностики та лікування, щоб зменшити вплив цього вірусу на населення. Одним із напрямків є розробка вакцин, які можуть запобігти інфекції або зменшити ризик розвитку ускладнень.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Проспективне дослідження виконано на зразках сироватки, отриманої з венозної крові пацієнтів, яких було обстежено в лабораторії клінічної імунології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України».

Ретроспективна оцінка показників інфікованості проведена за результатами 5252 досліджень, виконаних в лабораторії.

Об'єктом наукового дослідження виступала Епштейн-Барр вірусна персистенція в імунокомпетентних осіб.

2.2. Методи діагностики ВЕБ-інфекції

Для діагностики ВЕБ-інфекції в лабораторних умовах використовують два типи методів: полімеразну ланцюгову реакцію та серологічні методи дослідження. Серологічні методи включають в себе тест на виявлення гетерофільних антитіл та визначення специфічних антитіл методом ІФА. Завдяки останньому методу можна не тільки виявити наявність ВЕБ-інфекції, але й встановити стадію захворювання.

2.2.1. Серологічні методи дослідження. Для виявлення ВЕБ-інфекції серологічні тести є оптимальним варіантом; вони включають в себе виявлення специфічних антитіл до вірусного ядерного антигену (анти-EBNA-IgG) та капсидного антигену (анти-VCA-IgG, анти-VCA-IgM). Анти-VCA-IgM антитіла з'являються при ранній інфекції в організмі та зникають протягом 4-12 тижнів. Дещо пізніше (через 2-4 тижні після інфікування) виявляються IgG до VCA, максимальна концентрація яких спостерігається

також на початкових стадіях захворювання, поступово знижуючись. Проте ці антитіла визначаються протягом всього життя. Людина є сприйнятливою до ВЕБ-інфекції у випадку, якщо антитіла до вірусного капсидного антигену не виявляються [51].

Первинна ВЕБ-інфекція визначається у випадку серологічно ранньої появи антитіл IgM VCA. Вони можуть з'являтися ще до появи клінічних симптомів. У перші 6 тижнів від початку інфекції бувають високі титри антитіл, які зникають протягом 1–6 місяців. Також такий тип антитіл може виявлятися і при реактивації інфекції. Наявність антитіл VCA IgM на тлі відсутності анти-EBNA IgG є підтвердженням первинної інфекції. Характерною рисою хронічної вірусної інфекції Епштейна-Барр, пухлин, що спричинені цією інфекцією, а також аутоімунних захворювань і вторинних імунодефіцитних станів є тривала персистенція високих титрів антитіл до цього вірусу. Антитіла VCA IgM виявляються іноді в малому титрі при відсутності підтвердженої нещодавно перенесеної інфекції (наприклад, хронічна активна інфекція ВЕБ).

Досить рано (на 1-4 тижні) можуть з'явитися антитіла VCA IgG; вони досягають свого максимуму до 2 місяця захворювання. У більшості випадків ці антитіла виявляються на початку захворювання. При дослідженні в парних сироватках лише у 20% пацієнтів виявляють 4-кратне збільшення титру цих антитіл. Антитіла VCA IgG зберігаються довічно після одужання, та наявність цих антитіл свідчить про те, що інфекцію вже було перенесено, та про наявність імунітету до вірусу. У дітей до 7 років антитіла VCA IgG можуть не виявлятися. Якщо постійно присутні VCA IgG у високих титрах, то це вказує на хронічну фазу інфекції. Зазвичай негативний результат даного тесту виключає минулу інфекцію, але не завжди виключає гостру інфекцію, особливо у випадку, якщо кров було взято в період гострої фази, коли рівень VCA IgG ще не визначено. Для постановки діагнозу не достатньо результату одиничного тесту, оскільки його необхідно розглядати в комплексі з даними клінічних спостережень інших діагностичних процедур.

Дослідження авідності імуноглобулінів класу IgG до ВЕБ – метод обстеження, за допомогою якого можна визначити ступінь ефективності специфічної взаємодії між молекулами антитіл і антигенів, з якою швидкістю утворюється імунний комплекс, а також та повноту нейтралізації антигенів. Низькою авідністю відрізняються ранні вірусоспецифічні IgG антитіла, які утворюються при первинному інфікуванні, але протягом декількох тижнів або місяців вона зростає [59].

Анти-EBNA-IgG продукуються організмом через 2-4 місяці після появи симптомів, у більшості інфікованих їх високий рівень зберігається протягом всього життя. Відсутність антитіл EBNA IgG при наявності антитіл VCA IgM свідчить про поточну інфекцію, їх виявлення після раніше негативної реакції – про існуючу інфекцію. Якщо титр антитіл не змінюється при дослідженні в динаміці (в гострий період і при одужанні) – гостра інфекція, викликана ВЕБ, виключається. При реактивації ВЕБ-інфекції відбувається повторне збільшення титру антитіл EBNA IgG. У хворих із безсимптомною інфекцією виявлення EBNA IgG разом з антитілами VCA IgM і IgG використовується в диференціації ранньої стадії одужання від гострої фази інфекційного ІМ [33].

При одночасному виявленні IgG специфічних до EBNA та VCA можна стверджувати про наявність паст-інфекції.

Високоєфективно визначити стадії ВЕБ-інфекції дозволяють саме серологічні методи діагностики. Інтерпретація результатів серологічних досліджень наведена в таблиці 2.1 [7, 12].

2.2.2. Полімеразна ланцюгова реакція. Жоден із серологічних тестів не можна вважати виключно надійним при діагностиці ВЕБ-інфекції. З цією метою, корисним доповненням є метод ПЛР, особливо якщо використовувати його в якості підтверджуючого тесту в поєднанні з імунологією.

Провести визначення ДНК ВЕБ, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції, можна на різних біологічних матеріалах: сироватці крові, слині, лімфоцитах і лейкоцитах периферійної крові. При необхідності дослідження також проводять в біоптатах печінки, лімфовузлів, слизової

оболонки кишечника тощо. При наявності відповідної клінічної картини, виявлення ДНК вірусу в матеріалі, який досліджується, вказує на етіологічну роль вірусу в розвитку захворювання. Проте не завжди можна оцінити його роль в розвитку захворювання, оскільки це пов'язано з можливою тривалою персистенцією вірусу в організмі.

Таблиця 2.1

**Інтерпретація результатів комплексного серологічного тестування
при ВЕБ-інфекції**

Фаза інфекції	Анти- VCA IgM	Анти- VCA IgG	Наявність низькоавідних VCA-IgG	Анти- -EA- IgG	Анти- EBNA -1-IgG
Інкубаційний період або відсутність інфікування	—	—	не визначають	—	—
Дуже рання первинна інфекція	+	—	не визначають	—	—
Рання первинна інфекція	+	+	+	+	—
Пізня первинна інфекція	±	+	±	+	±
Атипова первинна інфекція	—	+	±	+	±
Реактивація	+	+	—	+	+
Рання паст-інфекція	—	+	±	+	+
Пізня паст-інфекція	—	+	—	—	+
Імуносупресія	—	+	—	—	—
Хронічна інфекція	±	+	—	+	±
Атипова реактивація	—	+	—	+	+

Для виявлення внутрішньоклітинних агентів використання у клінічній практиці даного методу в більшості випадків є ускладненим. Це пояснюється його високою чутливістю, оскільки неможливо розрізнити носія вірусу

(мінімальна кількість інфекції) від активного інфекційного процесу зі збільшенням кількості вірусу. Тому для клінічних досліджень часто використовують ПЛР-метод з меншою чутливістю, який забезпечує більш точний результат [8].

2.3. Імуноферментне визначення антитіл класу IgG до антигенів ВЕБ

Імуноферментна тест-система призначена для визначення наявності антитіл класу IgG до ядерного (EBNA) чи капсидного (VCA) антигенів ВЕБ у сироватці чи плазмі крові людини, з можливістю якісної та напівкількісної оцінки результатів.

2.3.1. Принцип аналізу. Для визначення антитіл класу IgG до антигенів ВЕБ використовується твердофазний ІФА, який базується на принципі "непрямого" тестування у два етапи. На першому етапі досліджувані зразки інкубуються з антигеном на твердій фазі; відбувається зв'язування з антитілами, якщо вони присутні у зразках. Потім лунки відмиваються, щоб видалити незв'язані компоненти і залишити специфічні комплекси антиген-антитіло. На другому етапі до системи додається кон'югат антивидових анти-IgG моноклональних антитіл із пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунними комплексами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів додається розчин хромогену 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину з перекисом водню, щоб виявити комплекси антиген-антитіло. Реакцію зупиняють після 30-хвилинної інкубації, додавши стоп-реагент. Оптична густина (ОГ) визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 нм, інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл у зразку [33].

2.3.2. Обладнання та матеріали, необхідні для роботи.

- спектрофотометр вертикального сканування призначений для вимірювання оптичної щільності розчинів у лунках, з використанням

довжини хвилі 450 нм як основної і діапазону 620-655 нм для порівняння; застосування інших довжин хвиль не дозволяється;

- термостат, який підтримує температуру на рівні 37 ± 1 °С;
- пристрій для промивання планшетів;
- побутовий холодильник;
- планшет для ІФА, де кожна лунка містить засорбований рекомбінантний антиген ВЕБ, відповідний до набору тест-системи (ядерний або капсидний);
- напіваавтоматичні дозатори з можливістю зміни наконечників для одного каналу, які дозволяють відбирати об'єми рідини від 5 до 5000 мкл;
- напіваавтоматичні дозатори з можливістю зміни наконечників для кількох каналів, які дозволяють відбирати об'єми рідини від 5 до 300 мкл;
- мірний циліндр об'ємом 100 і 1000 мл;
- одноразові медичні рукавички;
- лабораторний фільтрувальний папір;
- дистильована вода;
- позитивний контроль – розчин імуноглобулінів людини, які специфічні до веб-антигену, із додаванням консерванту;
- негативний контроль – сироватка крові людини без наявності антитіл до веб-антигену з додаванням консерванту;
- розчин для розведення сироватки – буферний розчин із екстрактом молока, детергентом та консервантом;
- розчин кон'югату моноклональних антитіл до IgG людини, з'єднаних з пероксидазою хрому, зі стабілізаторами та консервантом, готовий до використання;
- розчин ТМБ, що містить тетраметилбензидин, H_2O_2 , стабілізатор та консервант;
- стоп-реагент, що складається з розчину 0,5 М H_2SO_4 ;
- розчин для дезінфекції.

2.3.3. Застереження та техніка безпеки.

Застереження:

- Щоб отримати достовірні результати, перед проведенням аналізу слід обов'язково детально ознайомитись з інструкцією та дотримуватися процедур аналізу;
- Не слід використовувати компоненти ІФА-набору після закінчення терміну придатності, оскільки це може вплинути на точність результатів;
- Важливо не змішувати компоненти різних серій, компоненти з наборів різних нозологій або реагенти інших виробників;
- ІФА-набір та його компоненти не можна заморожувати, щоб уникнути зниження якості;
- Після використання реагенту слід закривати флакон кришкою, щоб зберегти якість реагенту;
- Під час промивання треба слідкувати за наповненням та переконуватися в повній аспірації розчину з лунок, щоб уникнути помилкових результатів;
- Щоб запобігти забрудненню та передачі можливих контамінантів, кожного разу слід використовувати новий наконечник піпетки для додавання зразків або реагентів;
- Слід захищати реагенти ІФА-набору від прямих сонячних променів;
- Перед використанням розчину ТМБ слід переконатися, що він має безбарвний колір, не використовувати розчин, якщо він має синій або жовтий колір, оскільки він може бути забрудненим, а також уникати контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів і використовувати чистий, добре промитий дистильованою водою посуд;
- Не використовувати один і той же посуд для розчину кон'югату та розчину ТМБ;

- Не оцінювати результати аналізу візуально без використання спеціального приладу;
- Додаткове обладнання, що контактує з біологічним матеріалом або компонентами набору, повинно бути очищене та продезінфіковане після використання;
- Компоненти, які були використані або залишилися невикористаними, повинні бути правильно утилізовані.

Техніка безпеки:

- Усі компоненти набору призначені виключно для діагностики *in vitro* та можуть використовуватися тільки фахівцями з відповідною кваліфікацією;
- Аналіз слід проводити тільки в одноразових рукавичках без порошку та захисних окулярах;
- У кімнаті, де проводиться тест, заборонено харчуватися, палити або використовувати косметику;
- Не піпетувати розчини ротом;
- Слід дотримуватися обережності і поводитися з досліджуваними та контрольними зразками так, як із матеріалами, які можуть бути потенційно небезпечними для здоров'я;
- Деякі компоненти у наборі можуть містити в своєму складі низькі концентрації шкідливих речовин, які здатні викликати подразнення шкіри та слизових оболонок; у разі потрапляння розчину ТМБ, стоп-реагенту або розчину кон'югату на шкіру чи слизові оболонки, необхідно промити пошкоджене місце великою кількістю води;
- Якщо розчин не містить кислоти (наприклад, сироватка), і відбулося його розбризкування, поверхню необхідно обробити дезінфікуючим розчином та витерти її насухо фільтрувальним папером; у випадку, якщо розчин містить кислоту, спочатку необхідно її нейтралізувати, використавши розчин бікарбонату натрію, а потім таким же чином витерти поверхню.

2.3.4. Рекомендації щодо забору, транспортування та зберігання зразків. Необхідно зібрати кров з вени і помістити її у стерильну пробірку, яка має бути позначена з ідентифікаційними даними пацієнта та датою забору. Цілу кров можна зберігати протягом 24 годин при температурі від 2 до 8 °C, не заморожуючи її.

Сироватку або плазму крові можна зберігати протягом не більше трьох діб за температури від 2 до 8 °C. Якщо потрібне більш тривале зберігання, то можна зберігати сироватку при температурі –20°C або –70°C. Перед використанням заморожених зразків необхідно розморозити їх і зачекати 30 хвилин при кімнатній температурі. Для досягнення однорідності зразків після розморожування їх слід перемішати. Важливо уникати повторного заморожування та розморожування досліджуваних зразків. Якщо зразки помутніли через наявність нерозчинних включень, їх можна очистити шляхом центрифугування при швидкості 3000 обертів на хвилину протягом 10-15 хвилин. Сироватки, які мають виражену ліпідемію, гемоліз або бактеріальний проріст, не підходять для використання.

Для транспортування зразків сироваток необхідно використовувати термоізоляційні контейнери. Для цього закриті пробірки, з обов'язковим маркуванням, необхідно помістити в поліетиленовий пакет, щільно закрити та помістити в центр термоконтейнера. Заморожені холодоелементи потрібно розмістити на дні, вздовж бічних стінок термоконтейнера і покрити ними зразки сироваток.

2.3.5. Проведення ІФА для виявлення антитіл до антигенів ВЕБ. Процедура аналізу проводилась таким чином (рис. 2.1):

1. Для роботи підготували проби пацієнтів та необхідну кількість лунок для аналізу, в яких засорбований рекомбінантний антиген ВЕБ (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів) і вставили їх в рамку ІФА-планшета.
2. Заповнили бланк внесення проб.
3. Приготували розчин для промивання.

4. В кожну лунку додали по 90 мкл буферного розчину.
5. Внесли по 10 мкл контролів специфічних до капсидного або ядерного антигену ВЕБ. Позитивний контроль (лунка А1) та негативний (В1, С1, D1 лунки), а в решту лунок по 10 мкл плазми крові. Обережно піпетували суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. При використанні всіх лунок планшета, час для внесення зразків не повинен перевищувати 10 хвилин.
6. Заклеїли стрипи клейкою плівкою та інкубували протягом 30 хвилин за температури 37 °С.
7. Після закінчення інкубації клейку плівку обережно зняли, а лунки промили п'ять разів за допомогою автоматичного промивача.
8. Після відмивання внесли по 100 мкл розчину кон'югату (вторинні антитіла). Вторинні антитіла мають приєднатися до Ig, які вже зв'язалися з антигеном в плащі. Використовували ванночку для реагентів для додавання кон'югату.
9. Стрипи покрили новим шаром клейкої плівки та залишили на інкубацію при 37 °С протягом 30 хвилин.
10. По закінченні інкубації обережно зняли клейку плівку та знову промили лунки п'ять разів.
11. Обережно додали 100 мкл розчину ТМБ у кожну лунку планшета, уникаючи контакту з дном та стінками. Цей розчин зробив реакцію кольоровою, утворивши блакитне забарвлення. Краще вводити розчин ТМБ в умовах зниженого освітлення.
12. Інкубували стрипи протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25 °С. Не використовували клейку плівку. В результаті виявили, що перша лунка з позитивним контролем має яскраво виражене блакитне забарвлення. У лунках з негативним контролем забарвлення було відсутнє. В інших лунках, з плазмою пацієнтів, при наявності антитіл до вірусу також спостерігали забарвлення.
13. До кожної лунки додали 100 мкл Стоп-реагенту з метою зупинити ферментативну реакцію. Спостерігали зміну кольору на жовтий.

14. Приступили до вимірювання оптичної густини в кожній лунці при довжині хвилі 450 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. На екрані рідера побачили вимірювання оптичної щільності та результати кількості антитіл. Перед здійсненням вимірювань перевірили, що зовнішня поверхня дна лунок чиста та відсутні бульбашки.

2.3.6. Облік результатів та їх інтерпретація. Обчислили середнє значення оптичної щільності для негативного контролю (N_c), визначили пороговий рівень (Cut off - CO) та індекс позитивного зразка (IP_{sample}).

$$N_c = (N_{c1} + N_{c2} + N_{c3}) / 3; \quad CO = N_c + 0.2;$$

$$IP_{sample} = OD_{sample} / CO \text{ де } OD_{sample} \text{ – ОГ зразка}$$

Для того щоб результати тесту вважалися достовірними, вони повинні відповідати наступним критеріям:

Control +	$ОГ \geq 1,5$
Control –	$ОГ \leq 0,15$
Control –	$N_c \times 0.5 \leq N_{cn} \leq N_c \times 2.0$

Якщо значення ОГ негативного контролю виходять за межі визначеного інтервалу, вважається, що дані тесту не є достовірними, тому це значення відкидається, а N_c розраховується за допомогою інших значень ОГ негативного контролю, які відповідають вимогам. У випадку, якщо більше одного значення оптичної густини негативного контролю не відповідає зазначеним критеріям, тест вважається непридатним і потребує повторного проведення.

$IP_{sample} > 1.1$	позитивний
$0.9 \leq IP_{sample} \leq 1.1$	невизначений
$IP_{sample} < 0.9$	негативний

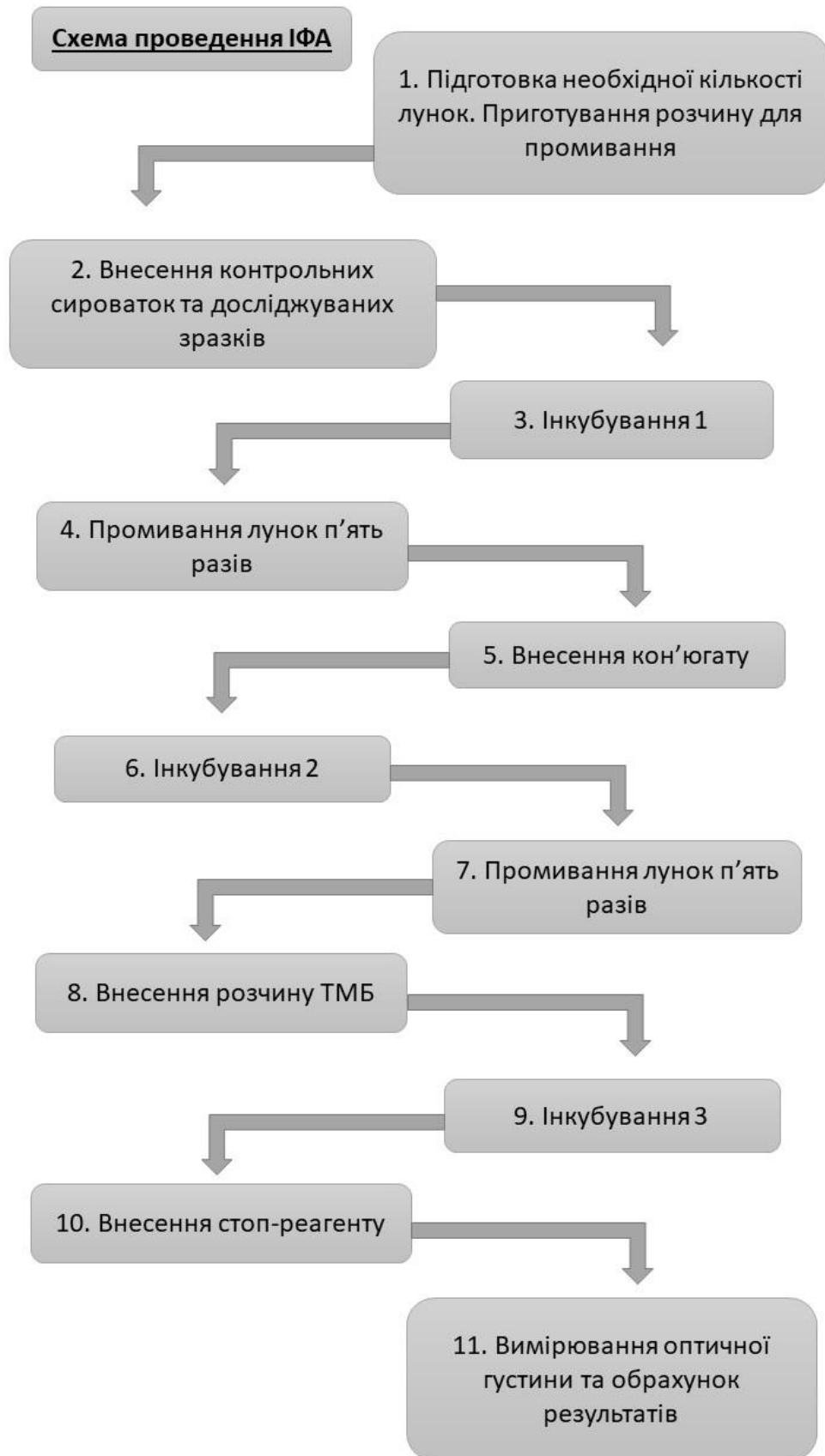


Рис. 2.1. Схема проведення імуноферментного аналізу.

Використання індексу позитивності дозволяє здійснювати порівняльний аналіз рівня специфічних антитіл у парних сироватках крові, отриманих з інтервалом 2-4 тижнів, що дозволяє оцінити динаміку збільшення або зменшення рівня антитіл. Щоб отримати правильну оцінку вмісту специфічних антитіл, важливо враховувати, що IP_{sample} повинен бути в межах 1,1-7,0, що пропорційно відображає вміст цих антитіл. Якщо IP_{sample} більше 7,0, для отримання коректного результату рекомендується повторити аналіз зразка, попередньо розведеного у 10 разів розчином для розведення сироваток. Після отримання значення IP_{sample} в такому випадку, його слід помножити на 10 для отримання кінцевого результату [55].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Загальна ВЕБ-персистенція обстежених контингентів (2018-2022 рр.)

Було здійснено ретроспективну оцінку контингентів, обстежених у лабораторії клінічної імунології та ізосерології ННЦРМ за 2018–2022 рр.

Відомо, що ВЕБ є одним з найпоширеніших вірусів серед людей. Більшість людей заражаються ВЕБ протягом життя, і у більшості випадків інфекція проходить без симптомів або зі симптомами, що нагадують застуду. Загальна ураженість ВЕБ імунокомпетентних осіб показує, який відсоток людей, що мають функціонуючу імунну систему, є зараженими ВЕБ. Визначення проводилися за допомогою аналізу крові на наявність антитіл до вірусу ВЕБ [8].

Загальна ураженість залежить від багатьох факторів, таких як вік, географічне розповсюдження та імунний статус людини. Вона варіює в різних країнах та регіонах світу. Наприклад, у розвинених країнах, таких як США, Австралія та країни Європи, більшість людей інфікуються ВЕБ до 20-25 років. У країнах, що розвиваються, таких як країни Африки та Південної Азії, інфікованість ВЕБ може досягати 90 % у дорослого населення. Загальна ураженість ВЕБ також залежить від імунного статусу людини – інфікованість вища у людей із слабкою імунною системою, наприклад, у людей з ВІЛ-інфекцією або у людей, що перенесли трансплантацію органів та отримують імуносупресивну терапію [15].

Антитіла – це білки, які виробляються імунною системою як відповідь на введення інфекційного агента, такого як ВЕБ. Якщо у крові виявлені антитіла до ВЕБ, це свідчить про те, що організм контактував із цим вірусом і розпочав виробляти антитіла для боротьби з інфекцією.

Важливо відзначити, що наявність антитіл до ВЕБ не завжди означає, що людина має активну інфекцію. Часто антитіла можуть залишатися в крові людини протягом довгого часу після того, як інфекцію вдалося подолати.

Загальна ураженість ВЕБ є важливим фактором, який допомагає оцінити ризик зараження та поширення цього вірусу.

Дослідження проводилося в лабораторії клінічної імунології ННЦРМ у відділі клінічної імунології та ізосерології впродовж 2018-2022 рр. Було залучено 5252 особи, які проходили обстеження на виявлення антитіл до антигенів ВЕБ. На основі отриманих даних було встановлено, що загальна ураженість імунокомпетентних осіб ВЕБ спостерігається у 85,2 %. І лише у 14,8 % людей не було виявлено антитіл ні до ядерного, ні до капсидного антигенів ВЕБ (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Загальна ВЕБ-персистенція уражених контингентів (2018-2022 рр).

3.2. ВЕБ-позитивні контингенти до антигенів вірусу Епштейна-Барр

Контингенти ВЕБ-позитивних людей можуть включати тих, у кого є активна інфекція ВЕБ, тих, хто переніс інфекцію у минулому, але продовжує мати антитіла до вірусу в крові, а також тих, у кого є латентна інфекція ВЕБ, коли вірус перебуває в неактивному стані, але залишається в організмі.

ВЕБ містить різні антигени, які викликають вироблення антитіл в організмі людини. Два найбільш поширених антигени ВЕБ – це ядерний антиген (EBNA) і капсидний антиген (VCA).

EBNA – це білковий антиген, вироблення якого зазвичай починається у людини після кількох тижнів від моменту інфікування вірусом. VCA – це антиген, який зазвичай виробляється в перший місяць після інфікування і залишається у крові протягом кількох місяців [13].

Проводячи тестування на наявність антитіл до ВЕБ, можна визначити наявність антитіл до ядерного антигену (EBNA або анти-EBNA) та наявність антитіл до капсидного антигену (VCA або анти-VCA).

Сумарна наявність антитіл до обох EBNA і VCA може свідчити про наявність давньої ВЕБ-інфекції. Якщо антитіла до обох антигенів знаходяться в крові, це може свідчити про те, що інфекція відбулася в минулому, і що організм виробив стійкий імунітет до вірусу.

Однак, наявність антитіл до одного або іншого антигену може бути різним у різних людей, залежно від стадії інфекції, віку, стану імунної системи тощо [13].

Із 85,2 % обстежених, які були ВЕБ-позитивні, встановлено, що 79 % були ВЕБ-позитивні сумарно по антитілах до ядерного і капсидного антигенів одночасно. Позитивними по антитілах до ядерного антигену та, одночасно, негативними по антитілах до капсидного антигену були лише 6,2 % обстежених (рис. 3.2).

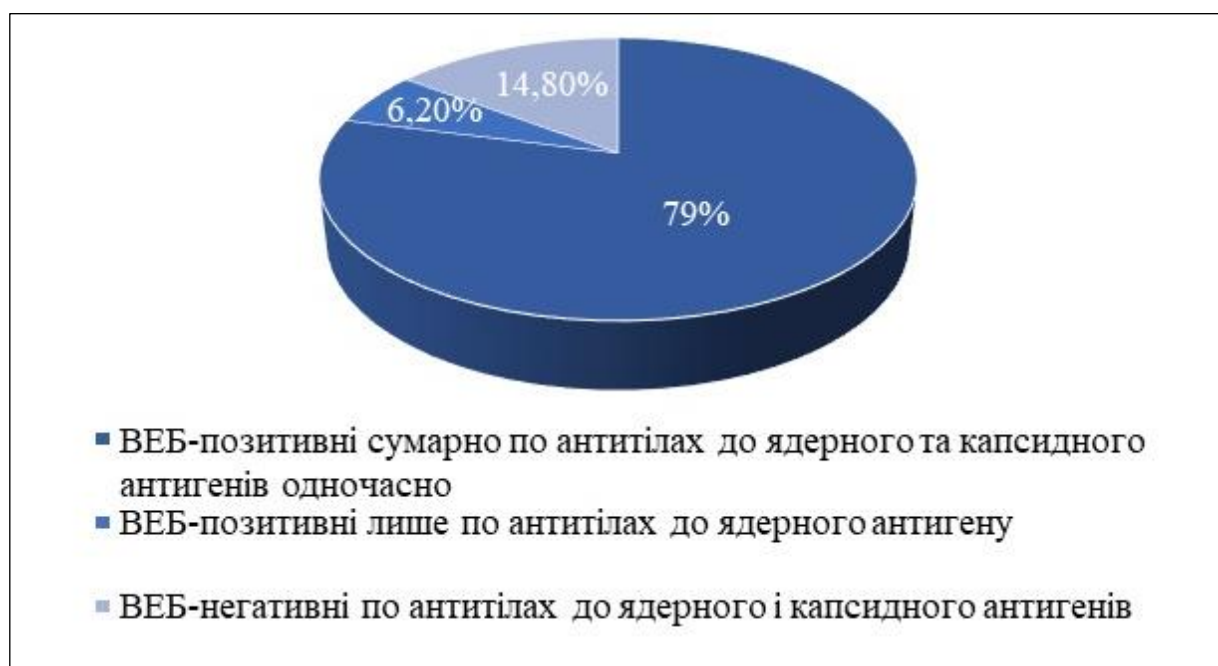


Рис. 3.2. ВЕБ-позитивні контингенти по антитілах до ядерного та капсидного антигенів (2018-2022 рр).

3.3. Співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками інфекційних захворювань

В організмі хазяїна ВЕБ здатен перебувати у вигляді моно- чи асоційованої інфекції.

Моноінфекція – це інфекційне захворювання, яке спричинене лише одним патогенним мікроорганізмом, тобто вірусом, бактерією, грибом або паразитом, без співіснування з іншими інфекційними збудниками. Моноінфекція досить проста в діагностиці та лікуванні, оскільки у пацієнта є тільки один збудник, і лікар може зосередитись на його лікуванні, без необхідності враховувати взаємодію з іншими інфекційними збудниками.

Асоційована інфекція – це взаємодія двох або більше видів вірусів, що спричинює захворювання. Віруси можуть взаємодіяти між собою або з іншими патогенними мікроорганізмами, що сприяє розвитку захворювання. Наприклад, деякі віруси можуть підтримувати життєдіяльність інших вірусів або знижувати ефективність імунної відповіді [38].

В результаті проведеної роботи у лабораторії клінічної імунології та ізосерології ННЦРМ (2018-2022 рр.) та на основі отриманих даних стало відомо, що персистуюча ВЕБ-інфекція у 83 % випадків є змішаною з іншими збудниками захворювань та утворює так звані міксти (рис. 3.3).

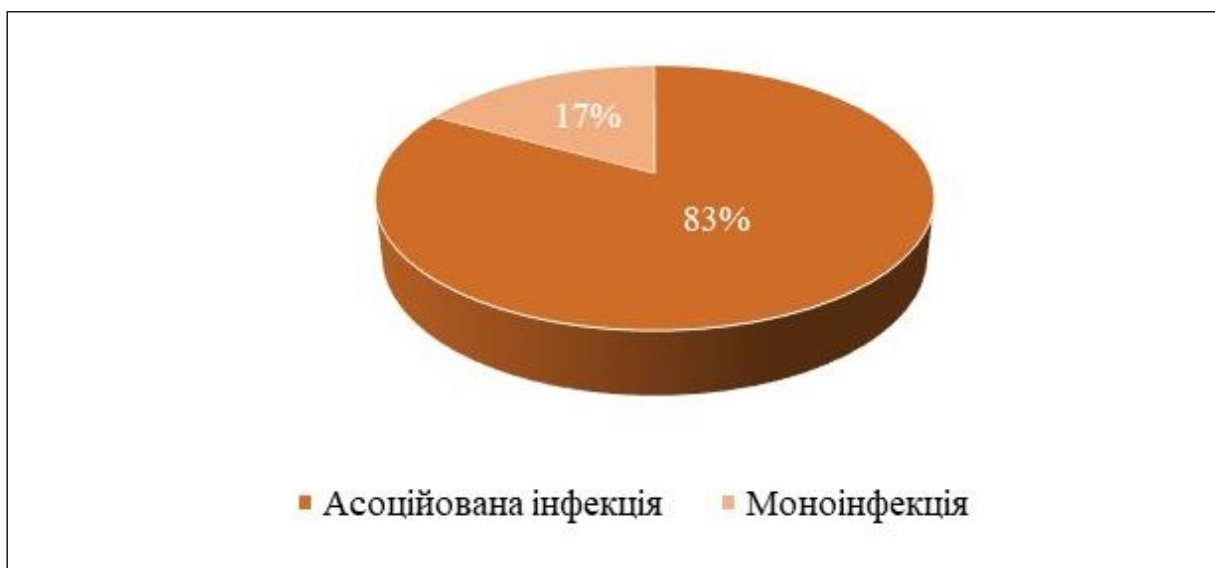


Рис. 3.3. Співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками інфекційних захворювань у ВЕБ-позитивних осіб.

Співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками означає, що людина може бути інфікована одночасно ВЕБ та іншими інфекційними збудниками. Таке співіснування може впливати на симптоматику, терміни та перебіг інфекції, а також на діагностику та лікування. Наприклад, ВЕБ може знизити імунітет людини, що робить її більш вразливою до інших інфекцій.

Отже, для лікарів та імунологів важливо знати про можливе співіснування ВЕБ-інфекції з іншими інфекційними захворюваннями при діагностуванні та лікуванні пацієнтів. Для цього зазвичай проводять комплексні дослідження, які включають аналізи на наявність антитіл до різних агентів [38].

3.4. Міксти (змішані інфекції) з вірусом Епштейна-Барр

Мікст-інфекція з ВЕБ є станом, при якому у людини виявляється одночасно декілька інфекцій, включаючи інфекцію ВЕБ. Це може відбуватися через те, що людина знаходиться в контакті з декількома інфекційними агентами. Якщо у людини є мікст-інфекція з ВЕБ, то інші інфекційні агенти можуть посилити симптоми ІМ та зробити його більш серйозним.

За результатами проведених лабораторних досліджень методом ІФА для визначення антитіл класу IgG до антигенів найпоширеніших вірусів, з якими співіснує ВЕБ, стало відомо які міксти зустрічаються найчастіше (рис. 3.4).

У більшості випадків персистуюча ВЕБ-інфекція буває змішаною з інфікуванням вірусами простого герпесу 1/2 типу, токсоплазмозу, цитомегаловірусу.

Серед цих вірусів найчастіше ВЕБ співіснує з цитомегаловірусом. Отримані дані із досліджень свідчать, що відсоток такої змішаної інфекції становить 40,5 %. Цитомегаловірус передається через безпосередній контакт з інфікованою кров'ю, слиною, сечею, секретами родових шляхів або материнським молоком. Він може спричинити захворювання, такі як мононуклеоз, пневмонію, запалення мозку та інші захворювання. Активація обох вірусів може призвести до спільних або різних захворювань. Наприклад, можуть виникати печінкові розлади або захворювання легень. Також може збільшуватися ризик розвитку раку та інших серйозних захворювань.

Ще одним вірусом, для якого можливим є співіснування з ВЕБ, є токсоплазмоз. Токсоплазмоз – це інфекційне захворювання, яке спричинюється одноклітинним паразитом *Toxoplasma gondii*. Результати досліджень показали, що співіснування ВЕБ та токсоплазмозу становить 13,5 % серед усіх обстежених. Їх співіснування може призводити до розвитку ракових захворювань [31, 34].

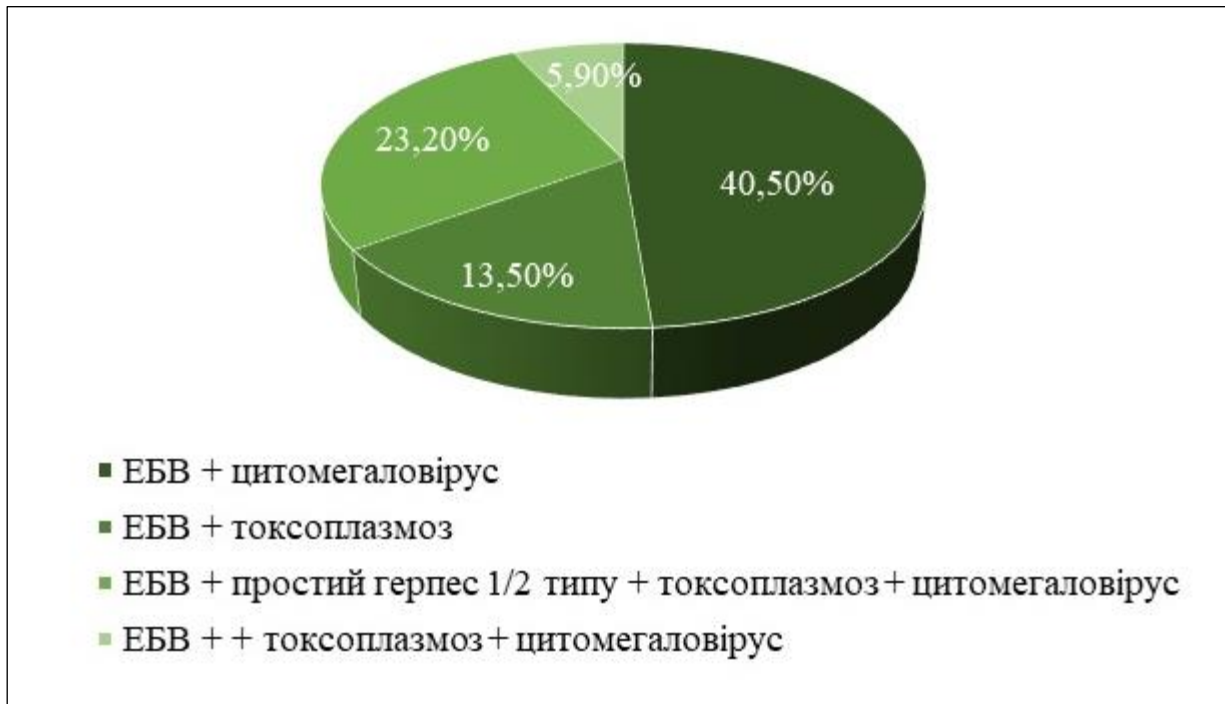


Рис. 3.4. Міксти (змішані інфекції) з вірусом Епштейн-Барр, які спостерігаються в уражених осіб.

Можливі випадки, коли організм людини уражений декількома вірусами одночасно. Наприклад, співіснування ВЕБ + простий герпес 1/2 типу + токсоплазмоз + цитомегаловірус. ВЕБ та вірус простого герпесу 1/2 типу належать до різних родів герпесвірусів і мають відмінні властивості та способи передачі. Ці віруси можуть співіснувати в організмі людини, але це не означає, що вони завжди взаємодіють між собою або підсилюють свої дії. Однак, дані показують, що у 23,2 % випадків ВЕБ одночасно утворює міксти з вірусами простого герпесу 1/2 типу, токсоплазмозу, цитомегаловірусу. А частота співіснування ВЕБ з токсоплазмозом та цитомегаловірусом становить 5,9 %.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Впродовж останніх 10 років в світі набагато збільшилася інфікованість вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ). Наразі в деяких регіонах вона може коливатись від 90 до 100 % [16, 13, 4]. В Україні ця інфекція є найпоширенішою герпесвірусною інфекцією.

У результаті того, що дуже часто будь-які симптоми інфекції відсутні, вірус дуже складно діагностувати, і в цьому полягає його небезпека. У деяких випадках люди можуть протягом всього життя і не підозрювати про наявність у них ВЕБ. Однак, слід приділяти особливу увагу діагностиці, оскільки захворювання провокує ураження різних тканин і систем органів.

Первинне інфікування призводить до того, що збудник довічно зберігається в організмі, проте періодично можлива реактивація. ВЕБ відіграє велику роль не лише в інфекційній патології, а також і в неврологічній, імунологічній, ревматологічній, онкологічній, гематологічній та імунологічній. Зростання захворюваності на ВЕБ-інфекцію в останні роки, ймовірно, пов'язано не лише з епідеміологічним підйомом, а й з тим, що покращились методи діагностики [8].

У ВЕБ виділяють декілька специфічних антигенів, таких як капсидний антиген (VCA), ядерний антиген (EBNA), ранні антигени (дифузний EAD та локалізований EAR) та мембранний антиген (MA), які мають різний час появи та біологічне значення. Якщо знати час появи цих антигенів та виявити до них антитіла, то можна з високою точністю діагностувати гостру, латентну та хронічну ВЕБ-інфекцію. Якщо спочатку з'являються антитіла до ранніх антигенів, а потім до ядерного антигену, то це свідчить про гостру інфекцію. А відсутність антитіл до ранніх антигенів, але наявність до капсидного та мембранного антигенів, свідчить про латентну інфекцію, яка сталася раніше [13].

Є ряд захворювань, асоційованих із ВЕБ, при яких спектр антитіл дуже відрізняється. До таких відносять ІМ, лімфому Беркітта, назофарингеальну

карциному. Хворі на ІМ мають антитіла різних класів імуноглобулінів, які належать до різних вірус-специфічних антигенів. Люди з лімфомою Беркїтта мають підвищені титри IgG-антитіл до EAR, тоді як пацієнти з назофарингеальною карциномою мають підвищені титри IgA-антитіл до EAD і VCA. Розмір пухлини пов'язаний з титрами антитіл, і при успішному лікуванні титри антитіл знижуються [7, 12].

У більшості випадків ВЕБ не має ніяких проявів, проте при ослабленні імунної системи людини він здатен активізуватися та в подальшому призвести до онкологічних захворювань, або ж викликати гострий мононуклеоз.

Дослідження було виконано на зразках сироватки, отриманої з венозної крові пацієнтів, яких було обстежено в лабораторії клінічної імунології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України». Ретроспективна оцінка показників інфікованості проведена за результатами 5252 досліджень, виконаних в лабораторії. Об'єктом наукового дослідження виступала Епштейн-Барр вірусна персистенція в імунокомпетентних осіб.

У лабораторній діагностиці ВЕБ-інфекції застосовують полімеразну ланцюгову реакцію та серологічні методи дослідження. До серологічних методів належать тест на виявлення гетерофільних антитіл та використання імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення специфічних антитіл. Останній метод дозволяє не лише встановити той факт, що інфікування ВЕБ наявне, а також визначити стадію чи форму захворювання [7].

На основі отриманих даних було встановлено, що загальна ураженість імунокомпетентних осіб ВЕБ спостерігається у 85,2 %. І лише у 14,8 % людей не було виявлено антитіл ні до ядерного, ні до капсидного антигенів ВЕБ.

Важливо відзначити, що наявність антитіл до ВЕБ не завжди означає, що людина має активну інфекцію. Часто антитіла можуть залишатися в крові людини протягом довгого часу після того, як інфекцію вдалося подолати.

Загальна ураженість ВЕБ є важливим фактором, який допомагає оцінити ризик зараження та поширення цього вірусу.

Контингенти ВЕБ-позитивних людей можуть включати тих, у кого є активна інфекція ВЕБ, тих, хто переніс інфекцію у минулому, але продовжує мати антитіла до вірусу в крові, а також тих, у кого є латентна інфекція ВЕБ, коли вірус перебуває в неактивному стані, але залишається в організмі.

Із 85,2 % обстежених, які були ВЕБ-позитивні, встановлено, що 79 % були ВЕБ-позитивні сумарно по антитілах до ядерного і капсидного антигенів одночасно. Позитивними по антитілах до ядерного антигену та, одночасно, негативними по антитілах до капсидного антигену були лише 6,2 % обстежених.

Сумарна наявність антитіл до обох EBNA і VCA може свідчити про наявність давньої ВЕБ-інфекції. Якщо антитіла до обох антигенів знаходяться в крові, це може свідчити про те, що інфекція відбулася в минулому, і що організм виробив стійкий імунітет до вірусу [13].

Однак, наявність антитіл до одного або іншого антигену може бути різним у різних людей, залежно від стадії інфекції, віку, стану імунної системи тощо.

В результаті проведеної роботи стало відомо, що персистуюча ВЕБ-інфекція у 83 % випадків є змішаною з іншими збудниками захворювань та утворює так звані міксти. Співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками означає, що людина може бути інфікована одночасно ВЕБ та іншими інфекційними збудниками. Таке співіснування може впливати на симптоматику, терміни та перебіг інфекції, а також на діагностику та лікування. Наприклад, ВЕБ може знизити імунітет людини, що робить її більш вразливою до інших інфекцій.

У більшості випадків персистуюча ВЕБ-інфекція буває змішаною з інфікуванням вірусами простого герпесу 1/2 типу, токсоплазмозу, цитомегаловірусу [31, 34].

Серед цих вірусів найчастіше ВЕБ співіснує з цитомегаловірусом. Отримані дані із досліджень свідчать, що відсоток такої змішаної інфекції становить 40,5 %. Цитомегаловірус передається через безпосередній контакт з інфікованою кров'ю, слиною, сечею, секретами родових шляхів або материнським молоком. Він може спричинити захворювання, такі як мононуклеоз, пневмонію, запалення мозку та інші захворювання. Активація обох вірусів може призвести до спільних або різних захворювань. Наприклад, можуть виникати печінкові розлади або захворювання легень. Також може збільшуватися ризик розвитку раку та інших серйозних захворювань.

Ще одним вірусом, для якого можливим є співіснування з ВЕБ, є токсоплазмоз. Токсоплазмоз – це інфекційне захворювання, яке спричинюється одноклітинним паразитом *Toxoplasma gondii*. Результати досліджень показали, що співіснування ВЕБ та токсоплазмозу становить 13,5 % серед усіх обстежених. Їх співіснування може призводити до розвитку ракових захворювань.

Можливі випадки, коли організм людини уражений декількома вірусами одночасно. Наприклад, співіснування ВЕБ + простий герпес 1/2 типу + токсоплазмоз + цитомегаловірус. ВЕБ та вірус простого герпесу 1/2 типу належать до різних родів герпесвірусів і мають відмінні властивості та способи передачі. Ці віруси можуть співіснувати в організмі людини, але це не означає, що вони завжди взаємодіють між собою або підсилюють свої дії. Однак, дані показують, що у 23,2 % випадків ВЕБ одночасно утворює міксти з вірусами простого герпесу 1/2 типу, токсоплазмозу, цитомегаловірусу. А частота співіснування ВЕБ з токсоплазмозом та цитомегаловірусом становить 5,9 %.

Наявність мікст-інфекції з ВЕБ може спричинити те, що інші інфекційні агенти можуть посилити симптоми інфекційного мононуклеозу.

ВИСНОВКИ

1. До параметрів, які характеризують Епштейн-Барр вірусну персистенцію, належать загальна ураженість вірусом Епштейна-Барр, обсяг ВЕБ-позитивних контингентів, а також показники співіснування ВЕБ-інфекції з іншими збудниками.

2. Імуноферментне визначення специфічних антитіл до різних антигенів вірусу Епштейна-Барр дозволяє диференціювати фази інфекційного процесу.

3. Інфікованість вірусами Епштейна-Барр контингентів, обстежених у лабораторії клінічної імунології і ізосерології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії наук України» в 2018-2022 рр., досягає **85,2 %**.

4. У більшості випадків персистуюча Епштейн-Барр вірусна інфекція виявлялась у вигляді мікстів:

вірус Епштейна-Барр + цитомегаловірус (40,5 %),

вірус Епштейна-Барр + цитомегаловірус + вірус простого герпесу 1/2 типів + токсоплазмоз (23,2 %),

вірус Епштейна-Барр + токсоплазмоз (13,5 %),

вірус Епштейна-Барр + цитомегаловірус + токсоплазмоз (5,9%).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беляєв В. О., Беляєва І. І., Кваша О. Є., Лук'янов Ю. О., Рибакowa І. М., Чернишова І. В. Клінічні рекомендації. Інфекційний моновірусний гепатит. Київ, 2012. – С. 65–69
2. Блохина Е.Б. Роль латентной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, в развитии лимфопролиферативных заболеваний. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2003. – Т.2. – № 3. – С. 65–70.
3. Борисов, Л. Б. "Микробиология, вирусология, иммунология." М. Мед. Информ. Агентство, 2001.–734 с (1994).
4. Виговська О. В., Шадрін В.О., Крамарьов С.О. Клініко-біохімічні особливості ураження печінки у дітей з Епштейна-Барр вірусною інфекцією //Современная педиатрия. – 2014. – №5. – С. 149–151
5. Волоха А. П., Чернишова Л. І. Епштейна-Барр-вірусна інфекція у дітей. Сучасні інфекції. 2003. С.70–74.
6. Дитячі інфекційні хвороби (Клінічні лекції). Підручник / За ред. проф. С. О. Крамарева. — К.:МОРІОН, 2003. – 480с.
7. Діагностика уражень центральної нервової системи вірусом Епштейна-Барр / Маричев І. Л. [та співавт.] // VI з'їзд інфекціоністів України. Клінічні проблеми боротьби з інфекційними хворобами – Одеса, 2002. –С. 249–251.
8. Дуда О.К., Колесник Р.О., Окружнов М.В., Бойко В.О. Клінічні форми хронічної Епштейна — Барр вірусної інфекції: питання сучасної діагностики та лікування. – Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ. – Журнал "актуальна інфектологія" – 2015. – № 1. – С. 15–20.
9. Загальна та спеціальна вірусологія: метод. вказ. для студентів II та III курсів мед. ф-ту /Упор.: А.Я. Циганенко, В.В. Мінухін, Н.В. Павленко та ін. – Харків: ХНМУ, 2009 – 120 с

10. Ковальова А. А., Кузьменко О. В., Інфекційний мононуклеоз. Імунопатогенез, клініка, діагностика, лікування, прогноз. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія, № 3, 2015.
11. Компанієць М.О., Бурлакова О.О., Березовська Т.В., Інфекційний мононуклеоз. // Український медичний часопис. – 2011. – № 4 (80). – С. 41–45.
12. Кононенко В. В. Етіологічна діагностика і класифікація герпесвірусних уражень центральної нервової системи. Нейроінфекції. Інші інфекційні хвороби / Кононенко В. В. // Матеріали наук.-практ. конф. і пленуму Асоціації інфекціоністів України. – Харків, 2001. – С. 78–81.
13. Крамарєв С.О. Клінічні прояви Епштейн-Барр вірусної інфекції у дітей //С.О. Крамарєв, О.В. Виговська // Сучасні інфекції, – 2008. – №4. – С.63–70
14. Крамарев С. А., Литвиненко Н. Г., Палатная Л. А. Эпштейн-Барр-вирусная инфекция у детей. Современная педиатрия. – 2004. – № 34(5). – С.13–18.
15. Кульмінська І.Ю. Особливості клінічного перебігу інфекційного мононуклеозу у дітей на сучасному етапі / І.Ю. Кульмінська // Врачебная практика. – 2006. – № 5. – С. 36 – 38
16. Леженко Г.О. Інфекційний мононуклеоз у дітей: клініко – імунологічна характеристика //Г.О. Леженко, О.В. Усачова, Є.А. Сіліна, Т.М. Пахольчук // Актуальная инфектология, – 2013. – №1(1). – С. 56–60
17. Литвиненко Н. Г. Епштейн-Барр-вірусна інфекція // Інфекційні хвороби у дітей (Клінічні лекції) / За ред. С. О. Крамарєва. — К.: МОРІОН, 2003. — С. 56–68.
18. Малашенкова И. К., Дидковский Н. А., Говорун В. М., Ильина Е. Н. Роль вируса Эпштейн–Барр в развитии синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции // Int. J. of Immunorehabilitation. 2000, № 1, с. 102–111.

19. Марков И. С. Диагностика и лечение герпетических инфекций и токсоплазмоза: Сб. ст. — К.: Издательство «АртЭк», 2002. — 192 с.
20. Никольский И. С., Юрченко В. Д., Никольская К. И. Характеристика активной хронической Эпштейна–Барр вирусной инфекции: клинико-иммунологический синдром //Современные инфекции. 2003, № 3, с. 60–62.
21. Рябоконт О. В., Оніщенко Т. Є., Рябоконт Ю. Ю. Інфекційні хвороби : навч. посіб. для студентів мед. ф-ту за спеціальністю 7.110.10 – "Стоматологія" – Запоріжжя : [ЗДМУ], 2011. – 205 с.
22. Сучасні наукові дослідження в біології, екології, медицині та фармації: збірник тез. — К.: Університет «Україна», 2019. — 110 с.
23. Филатов Н.: Лекции об острых инфекционных болезнях у детей в 2-х тт. Москва, А. Ланг, 1887
24. Юлиш Е.И., Волосовец А.П. Врожденные и приобретенные TORCH-инфекции у детей. – Донецк: Регина, 2005. – 216 с.
25. Chaganti, Sridhar, et al. "Epstein-Barr virus persistence in the absence of conventional memory B cells: IgM+ IgD+ CD27+ B cells harbor the virus in X-linked lymphoproliferative disease patients." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 112.3 (2008): 672–679.
26. Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma. // *Ann Oncol.* 2010. – Vol.21, Suppl.7. – P. vii308–312.
27. Cohen, Jeffrey I. "Epstein–Barr virus infection." *New England journal of medicine* 343.7 (2000): 481–492.
28. Cote, Weidner, Noel, et al. *Modern surgical pathology e-book*. Elsevier Health Sciences, 2009.
29. Epstein, M. A., et al. "Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma." *The Journal of experimental medicine* 121.5 (1965): 761–770.
30. Evans, AS (March 1974). «The history of infectious mononucleosis». *The American journal of the medical sciences* 267 (3): 189–95.

31. Fugl, Anders, and Christen Lykkegaard Andersen. "Epstein-Barr virus and its association with disease-a review of relevance to general practice." *BMC family practice* 20 (2019): 1–8.
32. Gulley, Margaret L., et al. "Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma." *American journal of clinical pathology* 117.2 (2002): 259–267.
33. Granström, Marta, et al. "Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme-linked immunosorbent assay using fimbrial hemagglutinin as antigen." *The Journal of Infectious Diseases* 146.6 (1982): 741–745.
34. Hanto, MD, Ph. D, Douglas W. "Classification of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative diseases: implications for understanding their pathogenesis and developing rational treatment strategies." *Annual review of medicine* 46.1 (1995): 381–394.
35. Hutt-Fletcher L.M. Epstein-Barr Virus Entry // *Journal of Virology*. – 2007.– Vol.81, No15. P.7825–7832.
36. Jeffrey I. Cohen, "The biology of Epstein-Barr virus: lessons learned from the virus and the host." *Current opinion in immunology* 11.4 (1999): 365–370.
37. Jerome, Keith R., ed. *Lenette's laboratory diagnosis of viral infections*. CRC Press, 2016.
38. Kawa, Keisei. "Epstein-Barr virus-associated diseases in humans." *International journal of hematology* 71.2 (2000): 108–117.
39. Kawaguchi, H., et al. "Epstein-Barr virus-infected T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome." *The Journal of clinical investigation* 92.3 (1993): 1444–1450.
40. Khanna R., Burrows S.R., Moss D. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1995. – Vol.59.– P.387–405.

41. Larsen, Laura. Sexually Transmitted Diseases Sourcebook. Health Reference Series Detroit: Omnigraphics, Inc., 2009.
42. Loong, H. H., Ma, B. B., & Chan, A. T. (2015). Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*, 386(10008), 64–76.
43. Manika, Katerina, et al. "Epstein-Barr virus DNA in bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis." *Sarcoidosis, Vasculitis, and Diffuse Lung Diseases: Official Journal of WASOG* 24.2 (2007): 134–140.
44. Meadows, L., Vanderplas, A., Naqvi, K. Current treatment strategies for adult patients with Burkitt lymphoma. *Current Oncology Reports, Blood*. 2021 Feb 11;137(6):743–750.;
45. Magrath, Ian. "Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma." *British journal of haematology* 156.6 (2012): 744–756.
46. Odumade, Oludare A., Kristin A. Hogquist, and Henry H. Balfour Jr. "Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections." *Clinical microbiology reviews* 24.1 (2011): 193–209.
47. Okano, Motohiko, et al. "Epstein-Barr virus and human diseases: recent advances in diagnosis." *Clinical microbiology reviews* 1.3 (1988): 300–312.
48. Orti A., Otero M.C. et al. Epstein-Barr Virus Mononucleosis: Neurologic Complications // *Clinical Pediatrics*. – 2003. – Vol 42(4). – P.361–364.
49. Periman P, P H Levine, D V Ablashi, I Royston. Cell mediated immunity during infectious mononucleosis to Epstein-Barr virus associated antigens. *Int J Cancer* 1977 Oct 15;20(4):506–11.
50. "Principles and practice of pediatric infectious diseases." Long, Sarah S., Larry K. Pickering, and Charles G. Prober. (2003): 98.
51. Roubalova,K., Roubal, J., Skopovy, P., et. al. Antibody Responses to Epstein-Barr Antigens in Patients with Chronic Viral Infection. // *Journal of Medical Virology*. – 1988. – 25(1) – P. 115–122.

52. Sakai, Yasunari, et al. "Interferon-alpha therapy for chronic active Epstein-Barr virus infection: potential effect on the development of T-lymphoproliferative disease." *Journal of pediatric hematology/oncology* 20.4 (1998): 342–346.
53. Sprunt TPV, Evans FA. Mononuclear leukocytosis in reaction to acute infection (infectious mononucleosis). *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*. Baltimore, 1920;31:410–417.
54. Sumaya, C.V., Jenson, H.B. Epstein-Barr Virus, In N.R. Rose (ed.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. – ASM Press Publishing, Washington, D. C., 1992. – P.568–575.
55. Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO European Region: update December 2012. No. WHO/EURO: 2012–4544–44307–62588. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2012.
56. Swerdlow, Steven H., et al. "The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 127.20 (2016): 2375–2390.
57. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer; Vol. 2. Lyon: 2008.
58. Wang, W.-Y., Twu, C.-W., Chen, H.-H., & Jan, J.-S. (2010). Radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma: where are we now? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(3), 202–217.
59. Вірус Епштейна-Барр, авідність антитіл IgG до капсидного антигену <https://protos.mk.ua/tests/virus-epshtejn-barra-avidnist-antitila-igg-k-kapsidnogo-antigenu/> (дата звернення: 28.04.2023)