

Epstein-Barr Virus 감염 진단을 위한 특이항체검사법과 중합효소연쇄반응법의 임상적 유용성

정재림 · 김현숙

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실

Clinical Usefulness of EBV-Specific Antibody Panel Test and PCR Genotyping in the Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infection

Jae Lim Chung, M.D. and Hyon-Suk Kim, M.D.

Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Epstein-Barr virus (EBV)-specific Ab ELISA using recombinant antigens is the most widely used method in the diagnosis of EBV infection. Recently sensitivity and specificity were greatly improved. But still the early antigen (EA)-IgM is too sensitive for discriminating the true EBV infection from secondary reactivation by other infectious agents or autoimmune diseases. So we compared EBV-specific panel test with PCR genotyping.

Methods : We studied 944 patients in Yonsei University Medical College Hospital who were suspected to have EBV infection. EBV-specific Ab panel test including EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG was performed and EBV PCR was also performed in 151 randomly selected patients. The test results were classified into 9 stages by optical density. EBNA 2 region was amplified by PCR using DNAs isolated from peripheral blood mononuclear cells.

Results : The seronegative rate was 9.9% given the EBV Ab panel results. Seronegative/primary infection was high in the pediatric group, past infection was high in the adult group, and reactivation was high in the ICU/transplanted group. The overall positive rate of EBV PCR in 151 patients was 35.8%, of which type 1 genotype was 55.6%, type 2 was 20.4%, and coinfection of type 1 and 2 was 24.1%. PCR results were all negative in seronegative group. PCR positive rates of primary infection and reactivation were high (41.7%, 43.5%, respectively).

Conclusions : EBV Ab panel and EBV PCR showed good correlation. EBV panel test was useful in the screening and staging of EBV infection. EBV PCR genotyping was also needed in confirming and determining prognosis of EBV infection especially in an immunocompromised host. (*Korean J Clin Pathol 2000; 20: 320-9*)

Key words : Epstein-Barr Virus (EBV), Ab Panel test, ELISA, Polymerase Chain Reaction (PCR), Genotyping, Epidemiology

서론

접 수 : 1999년 10월 14일

접수번호 : KJCP1346

수정본접수 : 2000년 6월 7일

교신저자 : 김 현 숙

우 135-720 서울시 강남구 도곡동 146-92

영동세브란스병원 임상병리과

전화 : 02-3497-3531, Fax : 02-3462-9493

E-mail : kimhs54@yumc.yonsei.ac.kr

1964년 Epstein 등이 버킵트림프종(Burkitt's lymphoma) 환자의 조직배양에서 처음으로 발견한 Epstein-Barr virus (이하 EBV라 약함)는 human herpes viridae에 속하는 B lymphotropic virus이다[1]. 이는 전염성단핵구증(infectious

mononucleosis)을 일으키는 주된 원인체이며[2], 종양발생과 밀접한 연관성을 갖고 있어서 버키트림프종, 비인강암(nasopharyngeal carcinoma), 호즈킨병(Hodgkin's disease), 중추신경계 B세포 림프종, 장기이식 또는 후천성면역결핍증에 연관된 림프세포증식성질환(lymphoproliferative disorder), 횡문근육종(leiomyosarcoma) 등을 일으킨다고 알려져 있다[3]. 또한 EBV와 연관된 인체 질환의 종류는 계속적으로 늘어나고 있으며 그 중요성이 매우 크다[4-8].

EBV는 EBNA단백을 합성하는 유전자부위의 염기서열 변이에 의해 2가지 유전자아형(genotype or ebnotype)으로 분류된다[9, 10]. 제1형은 가장 흔한 EBV의 원형으로 유럽, 미국, 중국 등에 많이 존재하고 제2형은 New Guinea 및 중앙아프리카의 버키트림프종 환자로부터 분리된 아형으로[11-13] T세포매개 면역기능의 이상이 있는 환자에서 많이 분리된다고 알려져 있다[14, 15].

EBV의 진단방법에는 EBV에 대한 항체를 측정하는 혈청학적 진단법과 직접 EBV의 항원을 측정하는 법이 있다. 혈청학적 진단법 중 면역 적혈구를 이용하는 이중응집소법(heterophil antibody test)은 민감도가 낮고 비특이적 반응이 많아서 현재는 널리 사용되고 있지 않다[16]. 최근에는 EBV 특이항체검사법이 많이 쓰이고 있는데 이는 EBV핵항원(Epstein-Barr virus nucleic antigen, EBNA), 초기항원(early antigen, EA), 바이러스캡시드항원(virus capsid antigen, VCA) 등을 사용하여, 이들에 대한 항체를 면역형광법(immunofluorescent method)이나 효소면역법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 측정한다. 특히 효소면역법을 이용한 혈청학적 검사법은 자동화가 가능하고 민감도 및 정밀도가 우수하여 EBV 감염의 진단에 가장 많이 사용되고 있으며 최근에는 그 진단효율을 높이고자 유전자재조합법으로 합성한 항원을 사용하기도 한다[17-19]. 그러나 이는 장기이식이나 자가면역질환 등으로 면역억제제를 투여받고 있는 환자나 선천성 혹은 후천성 면역결핍증 환자, 면역글로불린을 투여받은 환자에서는 해석하기 어렵다는 단점이 있다. 또, 정상인에서도 EBV 항체가 대부분 양성이고 오랫동안 지속된다는 점에서 급성기의 진단에는 EBV 특이항체 panel 검사가 유용하며 이때도 정확한 병기(stage)의 확인에 제한이 있다는 단점이 있다[8, 20]. 한편 직접 바이러스 자체를 검출하는 바이러스 배양법은 가장 정확한 방법이지만 배양조건이 까다롭고 시간이 오래 걸리기 때문에 실제 임상에 응용하기에는 어렵다[21]. 따라서 최근에는 바이러스 핵산검출법(nucleic acid detection)이 도입되었는데 Southern blotting, dot blotting, 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR), 동소보합결합법(in situ hybridization, ISH) 등이 이에 해당한다. 현재 민감도가 가장 우수한 검사에는 PCR법과 ISH법이 있는데 ISH법은 정확한 병변의 위치확인이 가능하다는 장점이 있으나 검사시간이 오래 소요되고 검사법이 복잡하며 표준화되어 있지 않기 때문에 실제로 임상에 적용하기 어렵다. 반면에 PCR법은 신속한 검사가

가능하고 소량의 다양한 검체에서도 검사가 가능하다는 장점이 있다. 또, viral load법을 사용하면 정량적으로도 측정이 가능하다[22, 23].

본 연구에서는 EBV 항체 panel검사(EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG)가 의뢰된 환자 944명을 대상으로 EBV의 혈청학적 유병률을 구해 보았고, 아울러 이중중합효소연쇄반응법(nested PCR)에 의한 EBV 유전자 아형분류를 동시에 시행함으로써 분자유전학적 유병률을 구해보았으며, 동시에 이 검사들의 임상적 유용성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상군

EBV의 혈청학적 역학조사를 위해서는 1998년 3월부터 10월까지 연세대학교 의과대학부속 세브란스병원 임상병리과에 EBV panel검사가 의뢰된 환자 944명의 혈청을 대상으로 하였고, 분자유전학적 역학조사를 위해서는 이들 중 무작위로 선택하여 전향적으로 EDTA 전혈 채취가 가능하였던 151명에 대해 이중중합효소연쇄반응법을 동시에 시행하였다. 또한 병력지 조사를 시행하여 임상소견 및 진단명을 확인하였다. 대상군은 전염성단핵구증, 초기감염 및 재감염이 의심되는 소아환자군 493명, 발열이 동반되며 EBV 감염이 의심이 되는 성인환자군 123명, 면역부진상태의 중환자실환자군 34명, 면역억제제를 투여받고 있는 이식환자군 79명으로 구성되어 있었다.

2. 방법

1) 특이항체 panel 검사법(EBV-specific antibody panel test)

EBV panel검사는 유전자재조합항원을 이용한 Anti-EBV recombinant EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG ELISA (Biotest AG, Frankfurt, Germany)를 사용하였다. 이는 효소면역법을 사용하는 kit로서 제조사의 지시서대로 검사를 실시하였고 결과는 Behring ELISA Processor II (Behringwerke AG, Marburg, Germany)로 492 nm에서의 흡광도치(optical density, O.D.)를 측정하였다. 검체의 흡광도치가 기준값(cut-off O.D.)보다 작으면 음성, 기준값보다 크고 0.5보다 작은 경우 약양성, 0.5보다 큰 경우 양성으로 하였고, 환자군의 감염상태를 Table 1의 기준을 근거로 해석하였다[24, 25].

2) 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)

(1) DNA 추출 : EDTA 혈액 5 mL로부터 Ficoll-hypaque (Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 단핵구를 분리하고 PBS (phosphate buffered saline)로 세포수를 1.5×10^7 /mL로 맞춘 부유액 100 μ L를 취하여 guanidine-detergent lysing

solution인 DNAzol-genomic DNA isolation reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

(2) 시발체(primer) 제조 : EBV DNA를 증폭하기 위한 oligonucleotide primer는 EBNA2 region (U2 region)을 사용하였다. EBV의 아형분류를 위하여 3쌍의 시발체가 사용되었다. 첫 번째 반응에는 공통 EBNA2 primer로 Ep1, Ep2를 사용하였고, 두 번째 반응에는 제 1형, 제 2형 특이 시발체인 Ap1, Ap2, Bp1, Bp2를 사용하였다. 시발체의 합성은 (주)바이오니아(충북 청원, 한국)에 의뢰하여 합성하였다. 시발체의 위치 및 염기서열은 Table 2와 같다.

(3) PCR 증폭 : PCR 반응을 위해서는 AccuPower™ PCR

Table 2. Synthetic oligonucleotide sequences used for amplification of EBV DNA

Loca- tion	Nucleotide position	Sequence (5' → 3')	Product size
EBNA2			
E2p1	1813-1833	AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA	596 bp
E2p2	2409-2388	TGG TGC TGC TGG TGG CAA T	
Ap1	1843-1866	TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA	497 bp
Ap2	2338-2314	ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C	
Bp1	2085-2104	CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA	150 bp
Bp2	2234-2215	AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG	

Table 1. Interpretative scheme of EBV-specific antibody panel test

EA-IgM	EA-IgG	EBNA-IgG	Interpretation	Comment
-	-	-	Seronegative	1. Possible very early stage of 1° infection 2. Possible past infection
+	-	-	Early stage of 1° infection	
w+/+	+	-	1° infection	Most frequent pattern among acute 1° infection
w+/+	+	w+	1° infection	1. Late stage of 1° infection 2. 2° decrease of EBNA-IgG by immunosuppression or immunodeficiency
-	+	-	Late stage of 1° infection	1. Possible chronic active EBV infection 2. 2° loss of EBNA-IgG by immunosuppression or immunodeficiency
w+	-	-	Questionable early stage of 1° infection	1. Possible seronegativity 2. Weak EA-IgM caused by polyspecific IgM Ab (Polyclonal stimulation)
w+/+	-	w+	Questionable late stage of 1° infection	1. Untypical pattern of 1° infection 2. 2° decrease of EBNA-IgG under immunosuppression (transplantation)
w+/+	+	+	Reactivation	Typical pattern of EBV reactivation eg. EBV-associated lymphoproliferative disease or epithelial carcinoma (i.e. nasopharyngeal ca)
+	-	+	Weak (2°) reactivation	1. Distinct EBV-ass. symptoms are less likely 2. Check for other infectious agent or autoimmune diseases
-	-	w+/+	Past infection	Possible seronegativity by passively transferred maternal IgG in newborns, after blood transfusion or immunoglobulin therapy
-	+	w+/+	Past infection	1. EA-IgG may persist indefinitely 2. Advanced stage of 1° infection 3. Possible 1° infection in newborn
w+	-	w+/+	Past infection	Weak EA-IgM is not clinically significant, often seen during other infections (co-stimulation of EBV)

Abbreviations: EA, early antigen; EBNA, Epstein-Barr virus nucleic antigen; -, negative (patient O.D. < cut off O.D.); w+, weak positive (0.5 ≤ patient O.D. < cut off O.D.); +, positive (patient O.D. > cut off O.D.); 1°, primary; 2°, secondary.

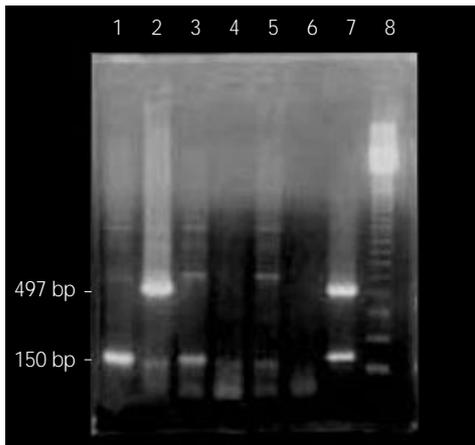


Fig. 1. Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of EBV PCR products. The 497 bp band is the product amplified from the EBNA2 region of type 1 EBV, and 150 bp band is type 2 EBV. Lane 8, molecular size marker with bands at 123, 246, 369, 492 bps; lane 2, PCR positive of type 1 EBV; lane 1, 3, PCR positive of type 2 EBV with decreasing intensity; lane 7, PCR positive of type 1 & 2 EBV (coinfection); lane 4, 5, 6, PCR negative.

PreMix (바이오니아, 충북 청원, 한국)를 사용하였다. 검체에서 추출된 DNA 용액 2 μ L와 시발체 E2p1, E2p2 각각 10 pmole씩을 반응액에 첨가한 후 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 μ L가 되게 하였다. 양성대조물질로는 EBV positive cell line인 B95-8 (ATCC CRL 1612, EBV transformed leukocyte, marmoset, Manassas, USA)을 이용하고 음성 대조물질로는 증류수를 사용하였다. PCR thermal cycler는 GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA)을 이용하여 30회 증폭과정을 시행하였다(94°C 1.5분간 denature, 60°C 1분간 annealing, 72°C 2분간 extension). 이중중합효소연쇄반응법(nested PCR)을 위해 1차 증폭산물에서 2 μ L를 취하고 시발체 Ap1, Ap2, Bp1, Bp2를 각각 10 pmole씩 첨가한 후 총 부피가 20 μ L가 되게 하여 1차와 마찬가지로 30 cycle의 제 2차 증폭과정을 시행하였다.

(4) 증폭된 DNA의 분석 : 증폭된 PCR 산물 10 μ L를 취하여 1.5% 한천젤(agarose gel)에서 molecular size marker (123

bp DNA Ladder, Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA)와 함께 전기영동하였다. 이를 ethidium bromide로 염색한 후 자외선투조기(UV transilluminator)로 관찰하여 증폭산물이 497 bp에서 관찰되면 제1형, 150 bp에서 관찰되면 제2형 EBV 양성으로 판독하였다(Fig. 1).

결 과

1. 특이항체 panel 검사법의 결과

전체 대상군 944명 중에서 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG 항체 모두 음성인 seronegative는 93명(9.9%)이었다. 즉 EBV에 한번이라도 감염이 되었던 경우가 90.1%이었다. 이 중에서는 past infection이 54.0%로 가장 많은 빈도를 차지하였고 다음으로는 reactivation이 19.5%, early, late stage 모두 포함한 primary infection이 11.9%, weak (secondary) reactivation이 4.8%의 빈도를 나타내고 있었다(Table 3). 이를 대상군으로 나누어 보았을 때 seronegative는 소아환자군에서 14.2%로 가장 많았고 성인환자군은 3.3%, 중환자실환자군에서는 5.9% (2예)의 빈도를 나타냈는데 중환자실환자의 1예는 EBNA-IgG의 O.D.값이 0.009인(cut off O.D.=0.159) 21세 여환으로 진정한 seronegative였고 다른 1예는 O.D.값이 0.148로 borderline값을 보이는 60세 여환으로 이는 원래는 past infection이지만 중환자실에서 면역부전상태가 되어 이차적으로 EBNA-IgG 항체의 역가가 감소된 경우로 추정되었다. Primary infection은 소아환자군에서만 20.5%로 많았고 성인 및 중환자실환자군에서는 없었으며 이식환자군에서 2.6% (2예)를 보였는데 1예는 w+/-/w+ 패턴을 보이는 30세 신장이식 여환으로 이는 past infection 또는 reactivation이나 EBNA-IgG가 이차적으로 면역억제에 의해 감소된 환자였고 다른 1예는 w+/-/- 패턴을 보이는 50세 신장이식 남환으로 EBNA-IgG의 O.D.가 0.096 (cut off O.D.=0.170)으로 borderline보다 약간 적은 O.D.값을 보여 이 환자에서도 원래는 reactivation이지만 이차적으로 EBNA-IgG가 감소된 환자

Table 3. Seroepidemiologic data of EBV-specific antibody panel test according to interpretative scheme (1998 March-October, n=944)

Reactivity	Total (%)	Pediatric patients	Adult patients	ICU patients	Transplant patients
Seronegative	93 (9.9)	70 (14.2)	4 (3.3)	2 (5.9)	0 (0.0)
Early stage of primary infection	24 (2.5)	23 (4.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Questionable early stage of primary infection	43 (4.6)	42 (8.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Primary infection	33 (3.5)	27 (5.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
Late stage of primary infection	2 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Questionable late stage of primary infection	10 (1.1)	8 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
Reactivation	184 (19.5)	79 (16.0)	26 (21.1)	10 (29.4)	26 (32.9)
Weak (secondary) reactivation	45 (4.8)	19 (3.9)	10 (8.1)	1 (2.9)	6 (7.6)
Past infection	510 (54.0)	224 (45.4)	83 (67.5)	21 (61.8)	45 (57.0)
Total	944 (100.0)	493 (52.2)	123 (13.0)	34 (3.6)	79 (8.4)

있을 것으로 추정되었다. 건강한 성인에서 가장 흔한 반응패턴인 past infection은 성인환자군에서 67.5%로 가장 많았고 reactiva-

Table 4. Seroepidemiologic data of EBV-specific antibody panel test according to each panel (1998 March-October, n=944)

Reactivity	EA-IgM (%)	EA-IgG (%)	EBNA-IgG (%)
-	500 (53.0)	577 (59.0)	192 (20.3)
w+	277 (29.3)	-	44 (4.7)
+	167 (17.7)	387 (41.0)	708 (75.0)
Total	944 (100.0)	944 (100.0)	944 (100.0)

Abbreviations: -, negative (patient O.D.<cut off O.D.); w+, weak positive (0.5≤patient O.D.<cut off O.D.); +, positive (patient O.D.>cut off O.D.).

Table 5. Age distribution of EBV primary infection (n=104)

Age	Frequency	%	Cumulative %
1	17	16.3	16.3
2	34	32.7	49.0
3	15	14.4	63.5
4	18	17.3	80.8
5	4	3.8	84.6
6	5	4.8	89.4
7	3	2.9	92.3
8	3	2.9	95.2
11	1	1.0	96.2
12	1	1.0	97.1
13	1	1.0	98.1
15	1	1.0	99.0
19	1	1.0	100.0
Total	104	100.0	100.0

tion은 이식환자군과 중환자실환자군에서 빈도가 많았다(Table 3). 또한 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG 각각의 panel에 대한 반응 양상은 Table 4와 같았다. 그리고 primary infection의 양상을 나타내는 환자 112명 중 병력조사가 가능하였던 환자 104명에 대한 연령 분포는 Table 5 및 Fig. 2와 같았다. 생후 2세때가 32.7%로 EBV 일차감염의 가장 흔한 시기로 나타났고 생후 4세까지 15% 이상의 빈도를 보였으며 생후 5세 부터는 5% 미만의 일차감염 빈도를 나타내고 있었다. 따라서 EBV의 일차감염은

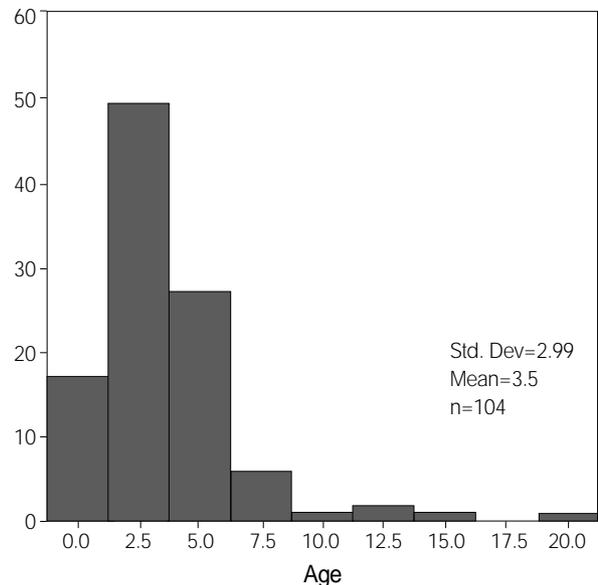


Fig. 2. Histogram of age distribution of EBV primary infection.

Table 6. EBV genotypes according to categorized group

		n	PCR + (%)	Type 1 (%)	Type 1 & 2 (%)	Type 2 (%)
EBV serology panel group	Seronegative	10	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Primary infection	12	5 (41.7)	4 (80.0)	0 (0.0)	1 (20.0)
	Reactivation	46	20 (43.5)	10 (50.0)	4 (20.0)	6 (30.0)
	Weak (secondary) reactivation	9	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
	Past infection	74	28 (37.8)	16 (57.1)	9 (32.1)	3 (10.7)
	Total	151	54 (35.8)	30 (55.6)	13 (24.1)	11 (20.4)
Patient group	Pediatric patients	49	10 (20.4)	7 (70.0)	1 (10.0)	2 (20.0)
	Adult patients	46	9 (19.6)	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)
	ICU patients	8	4 (50.0)	2 (50.0)	2 (50.0)	0 (0.0)
	Transplantation patients	48	31 (64.6)	15 (48.4)	8 (25.8)	8 (25.8)
	Total	151	54 (35.8)	30 (55.6)	13 (24.1)	11 (20.4)
Disease group	Infectious mononucleosis	19	8 (13.0)	7 (87.5)	0 (0.0)	1 (12.5)
	Nasopharyngeal cancer	3	2 (3.7)	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Lymphoproliferative disease	4	1 (1.9)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Transplantation	48	31 (57.4)	15 (48.4)	8 (25.8)	8 (25.8)
	Pneumonia	10	6 (11.1)	3 (50.0)	3 (50.0)	0 (0.0)
	Others	67	7 (13.0)	3 (42.9)	2 (28.6)	2 (28.6)
	Total	151	54 (35.8)	30 (55.6)	13 (24.1)	11 (20.4)
Transplantation group	Uncomplicated transplantation patients	20	9 (45.0)	3 (33.3)	4 (44.4)	2 (22.2)
	Complicated transplantation patients	28	22 (78.6)	12 (54.5)	4 (18.2)	6 (27.3)
	Total	48	31 (57.4)	15 (48.4)	8 (25.8)	8 (25.8)

80.8%에서 4세 이전에 일어나는 것을 알 수 있었다.

2. 중합효소연쇄반응법을 이용한 EBV의 유전자 아형분류

EBV panel검사에 따른 PCR 결과를 보면 151명의 검체에 대하여 PCR 검사를 시행한 결과 54예에서 양성을 보여 총 35.8%의 양성률을 나타내었다(Table 6). 그 중 제1형이 30예(55.6%), 제2형이 11예(20.4%), 1형과 2형의 동시감염이 13예(24.1%)로 나타났다. 각각 panel검사별로 보았을 때는 primary infection, reactivation, past infection이 각각 41.7%, 43.5%, 37.8%에서 양성을 보였고 primary infection일 때는 제1형이 우세하였고(4:1), past infection일 때도 제1형이 비교적 우세하였으며(25:12), reactivation일 때는 두가지 아형이 비슷하게 검출되었다(14:10).

환자군에 따른 PCR 결과는 소아와 성인환자군에 비하여 중환자실환자군 혹은 이식환자군에서 양성률이 높았다. 그리고 소아, 성인환자군에서는 제1형이 우세하였고 면역기능이 저하된 중환자실환자, 이식환자군에서는 제2형의 빈도가 비교적 높았다.

질환군에 따른 PCR 결과는 신장이식환자에서 가장 양성률이 높았으며 이들에서는 제2형도 비교적 흔하게 관찰되었다. 그리고 전염성단핵구증, 비인강염, 피부의 림프세포증식성질환 환자에서는 제1형이 단연 우세하였다. 폐렴환자에서는 대부분 세균배양에서 음성을 보이며 다른 진단증세를 같이 동반하는 환자가 많았으며 주로 제1형이 많았다. 특히 이식환자군에서의 PCR 결과는 환자의 임상적 특징을 확인한 후 다른 합병증이 없는 환자군과 이식신 거부반응, 감염, 중앙, 발열 등의 합병증이 동반된 환자군을 대별하여 PCR 양성률을 조사해 본 결과 합병증이 동반된 환자군에서 PCR 양성률이 높았으며 제1형이 우세한 빈도를 나타내었다. 이들에서 혈청학적 검사법은 past infection이 57%, reactivation이 32.9%로 나타나 이식환자군에서는 PCR 검사법이 임상상과 잘 일치하였으며 신뢰도가 높았다.

고 찰

본 연구에서는 Epstein-Barr virus 감염의 진단을 위한 검사법을 평가해보기 위하여 혈청학적 검사법인 EBV-specific panel검사와 EBV PCR법을 비교하였다. 본 연구를 시작하게 된 배경은 급성감염의 지표로 사용되는 EA-IgM의 양성률이 비교적 높아서 EA-IgM 양성일 때 이것이 진정한 EBV에 의한 감염인지 아니면 다른 인자에 의한 위양성 반응인지를 알아보기 위한 것이었으며, PCR법과 병력조사를 통해 임상상과의 상관성을 비교해 보았다. EBV-specific antibody panel검사의 각 항목은 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG로서 전통적으로 많이 사용되어왔던 VCA-IgM, VCA-IgG는 이번 실험에 사용되지 않았다. 이는 VCA 항체의 대산균에 따른 양성률과 rheumatoid factor 등에

의해 위양성이 나타나는 등 정확도에 문제가 있어 현재 많이 쓰이고 있지 않기 때문이다[26, 27]. 또한 제조방법으로 제조한 p150이라는 VCA 항원이 원하는 강도의 면역반응을 보이지 않았고 앞에서 설명한 여러 교차반응이 나타날 수 있어 VCA항체검사를 시행했을 때 더 이상 민감도나 특이도를 증가시키지 못하였기 때문에 알려져 있다. Biotest® Anti-EBV ELISA system은 유전자제조항원 즉, EA-complex 중 protein p45와 protein p138에 대한 IgM, IgG 그리고 EBNA 중 protein p72에 대한 IgG를 검사함으로써 이러한 문제들을 보완할 수 있으며 다양한 자가항체에 의해서도 방해받지 않도록 개발되었다[17].

1998년 3월부터 10월까지 본원에서 EBV panel검사가 의뢰된 환자 944명에 대하여 살펴본 결과 Table 4의 EA-IgM의 reactivity에 따른 빈도를 보면 (-), (w+), (+) 각각 53.0%, 29.3%, 17.7%였다. 기존에는 (w+)와 (+) 모두 EA-IgM 양성으로 보고하였으나 새로운 EBV 결과해석법으로는 O.D.값 0.5를 기준으로 나누었으며, (w+)인 경우에는 EBV 자체의 감염에 의한 것보다는 다른 질환에 의해 co-stimulation 또는 secondary activation된 경우가 있을 수 있다(Table 1). 또한 EBNA-IgG 음성인 경우가 20.3%였다. 기존의 보고에서는 VCA-IgG의 경우는 5세만 되어도 1:20 screening titer에서 100% 양성률을 보였다고 하였는데[26], EBNA-IgG가 좀 더 특이도가 높은 것으로 생각된다.

현행 의료보험에서는 처음에 EBNA-IgG를 시행한 경우 보험급여 삭감되고 있다. 그러나 EA-IgM, EA-IgG만을 시행하는 경우 이들이 양성이면 acute primary infection상태인지 reactivation상태인지를 구별할 수 없고, 음성일 경우는 환자가 seronegative상태인지 past infection상태인지를 감별할 수 없다. 특히 이식환자군에서는 seronegative상태를 진단하는 것이 중요한데 그 이유는 EBV seronegative인 장기 수여자가 공여자 장기 내의 EBV에 의해 감염이 되어 치명적인 림프세포증식성질환(post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD)을 일으켰다는 보고가 있기 때문이다[28]. 또 다른 보고에서는 PTLD의 위험인자로서 항림프세포글로불린(anti-lymphocyte globulin)과 cyclosporine 혹은 tacrolimus의 동시 사용, acute primary EBV infection, 구인두(oropharynx)에서의 EBV의 다량 증식, CMV 선형감염 등을 거론하였는데 여기서도 primary infection의 중요성을 강조하고 있다[29-32]. 따라서 장기이식환자를 포함한 모든 EBV의 감염이 의심되는 환자의 정확한 병기를 규명하기 위해서는 EBNA-IgG를 포함한 panel검사가 반드시 필요할 것으로 사료되었다. 소아환자군에서 EBV 일차감염의 연령별 분포를 본 결과(Table 5) 생후 2세에 32.7%로 가장 많은 일차감염 빈도를 보였고 생후 5세까지 84.6%에서 일차감염이 일어나는 것을 알 수 있었다. 이는 VCA-IgG가 생후 5세에서 100% 양성이었다는 보고[26]와 약간 차이를 보였는데 가능한 원인은 VCA-IgG가 비특이적 반응이 많다는 것과[17, 27], EBV의 감염은 공중위생이나 사회경제적 여건이 좋은 선진국에서는 주로 청소년기에 감

염되고 후진국에서는 주로 유아기에 감염된다고 알려져 있는데 [2], 우리나라도 점차 선진국화됨에 따라 일차감염 발병의 연령이 높아지는 것으로 추정해 볼 수 있겠다.

국내에서의 EBV에 대한 분자유전학적인 연구는 일부 저자들이 보고한 바 있었다. 그러나 이는 주로 EBV와 특정 질환과의 연관성 내지는 증례보고의 형식으로 보고되었고[33-36], 대상군에 따른 EBV 유전자 아형분류에 대한 보고는 아직 없었다. 본 연구결과 국내 EBV 유전자 아형분류는 총 151명의 검체 중 54명에서 양성을 보여 PCR 양성률은 35.8%였고 이 중 제1형, 제1 및 2형, 제2형이 각각 56%, 24%, 20%를 차지하였다. 외국의 문헌과 비교해보면 1994년 호주에서는 52%, 14%, 33%[37], 1997년 미국에서는 52%, 36%, 12%[38], 1998년 영국에서는 68%, 26%, 6%로[39], 영국과 미국에 비해 우리나라는 제2형의 빈도가 많았고 호주에 비해서는 적은 빈도로 나타났다. EBV panel 검사결과와 비교해 보았을 때 seronegative에서는 모두 PCR 음성이었으며 primary infection과 reactivation일 때 PCR 양성률이 가장 높았다. 그리고 weak (secondary) reactivation의 경우는 11.1%의 낮은 양성률을 보였는데 이는 weak reactivation이 직접 EBV에 의한 경우보다는 다른 질환에 의한 이차적인 EBV의 약한 reactivation이기 때문인 것으로 생각되었다. 유전자 아형은 primary infection일 때는 제1형에 의한 감염이 대부분이었고 past infection이나 reactivation의 경우는 제2형의 중복감염 혹은 단일감염도 흔하게 관찰할 수 있었다. 다른 문헌에서 EBV 항체검사법과 PCR 결과를 비교한 경우를 찾아 볼 수 있었는데[40] 여기서는 단순히 EBV 항체 양성률과 PCR 결과만 비교하였고 본 연구에서와 같이 EBV panel에 의한 EBV 감염의 각 병기(stage)별로 구분하여 PCR 결과와 비교하지는 않았으며 아형분류도 시행하지 않았었다. 환자군에 의한 분류를 보면 면역억제제를 투여받고 있는 이식환자군에서 64.6%로 가장 높은 양성률을 나타내었고 제2형에 의한 감염도 흔했다. 중환자실환자군에서도 50.0%로 두 번째로 높은 양성률을 보였는데 이는 중환자실의 환자들이 면역부전상태의 환자들이 많기 때문으로 생각되었다. 상대적으로 면역기능이 정상인 소아와 성인 환자군에서는 양성률이 20.4%, 19.6%로 낮았고 제1형에 의한 감염이 많았다. 그리고 PCR 검사에서 양성인 환자들의 질환을 분류해 본 결과 역시 이식환자군이 가장 많았다. 그리고 이식환자군에서도 합병증을 동반한 이식환자군에서 합병증을 동반하지 않은 이식환자군에 비해 양성률이 78.6%로 더 높았으며 이 때에도 제1형에 의한 감염이 많았다. 전염성단핵구증은 8명에서 양성을 보였는데 그 중 7명이 제1형이었다. 그리고 비인강암이 2명, 피부의 림프세포증식성질환이 1명 있었는데 이들도 모두 제1형에 의한 감염이었다. 다음으로는 폐렴환자가 많았으며 기타 환자에서는 *Cryptococcus neoformans* 수막염, HBsAg 보균자, 류마티스성관절염, 재생불량성빈혈 등 세포면역체계의 이상이 있는 환자가 제1형과 제2형 모두에서 많이 관찰되었다. 이는 EBV의 중복 감염이 T 세포매개 면역체계의 이상이 있는 환자군에서 많았다

는 다른 보고와 일치하였다[14, 15, 39, 41].

이상의 결과로 미루어 볼 때 우리나라에서의 전염성단핵구증 EBV의 급성 일차감염이나 비인강암, 림프종 및 장기이식 후 림프세포증식성질환 등 EBV에 의해 생기는 중요한 질환은 주로 제1형 EBV에 의해 생기는 것으로 생각된다. Rickinson 등에 의하면 제2형 EBV는 in vitro에서 B-cell transformation 능력이 제1형에 비해 매우 떨어지고 바이러스의 증식이 나쁘며 세포의 생존능력(viability)이 세포밀도에 의존적이라고 보고하였다[42]. 따라서 제2형 EBV는 제1형보다 질병을 일으키는 능력이 떨어질 것이라는 추측과 동일한 결과를 보였다. 또한 여러 저자들이 비인강암[43], 호즈킨병[44], PTLN[45] 등에서 제1형이 지배적이었다고 보고하였다. 그러나 또 한편으로는 면역부전상태가 동반된 호즈킨병[46]과 비호즈킨림프종[47], 치사중심선육아종(lethal midline granuloma)[48] 등은 제2형에 의한 감염도 많았다는 보고도 있었고, 일부에서는 특정한 바이러스 주(strain)가 특정 질환과 연관되어있다고 보기보다는 그 지역에서 지리적으로 많은 분포를 보이는 바이러스가 그 지역에서의 특정한 질환과 연관되어있다고 보고하기도 하였다[49-51]. 이 이론에 의해서도 더 연구조사가 필요하겠지만 우리나라에서는 제1형이 많이 분포하고 일으키는 질환도 많은 것으로 생각된다.

본 연구에서 단일질환 환자군으로서 가장 많았던 것은 이식환자군으로서 이식 후 EBV 감염에 대한 검사는 이미 여러 보고에서 그 중요성을 입증하고 있다[32, 52, 53]. 이식환자군에서 PCR 양성률이 가장 높았고 또한 제2형에 의한 감염도 많은 편이었다. 그런데 panel 검사결과가 reactivation뿐만 아니라 past infection의 경우에서도 PCR의 양성률이 많이 관찰되었는데 이는 아마도 cyclosporine 등과 같은 면역억제제를 투여받음으로 인해 T 림프구의 EBV에 감염된 세포에 대한 감시기능(surveillance)이 현저하게 감소되어 peripheral EBV viremia를 일으키는 경우가 많으며 또한 항체생성기능도 억제되어 EBV에 대한 항체를 제대로 만들어내지 못하므로 혈청학적 검사상 음성으로 나올 수도 있는 것으로 추정해 볼 수 있었다. 그렇지만 명백한 점은 혈청학적 검사가 past infection이라도 PCR 양성군이 PCR 음성군에 비하여 임상적으로 여러 합병증을 동반한 중증의 환자인 경우가 많았다. 따라서 이식환자군에서는 EBV PCR 검사가 매우 중요하다고 볼 수 있겠다. 이는 다른 문헌보고와 일치한다[54-57]. 또한 이식환자군에서 EBV 추적검사(monitors)가 중요한 이유는 이식 후 림프세포증식성질환이 생길 수 있으며 이는 임상적으로 이식신 거부반응(graft rejection)과 감염진단하기가 매우 어렵기 때문이다[58-60]. 또한 전자의 경우는 면역억제제 투여를 줄이고 acyclovir, ganciclovir 등을 투여해야 하나 후자는 면역억제제 투여량을 증가시키거나 anti-lymphocyte globulin, steroid pulse therapy 등을 시행해야 하므로 그 치료방법이 완전히 반대이다. 이는 만약 잘못 치료하는 경우에는 환자의 생명과도 연관되는 매우 중요한 문제이다. McDiarmid 등은 이식 후 EBV PCR monitoring을 하면서 PTLN의 고위험군에서 예방적으로

ganciclovir를 투여한 경우 PTLD의 빈도를 매우 낮추었다고 보고하였다[61].

이상의 결과를 종합할 때 우리나라의 EBV 감염은 주로 제1형에 의한 경우가 많았으나 이식환자군에서와 같이 세포매개 면역기능이 억제된 환자에서는 제2형에 의한 경우도 미국, 영국에 비하여 높았다. 또한 이들에서의 panel검사와 PCR 결과는 비교적 상관관계가 높았으며 특히 PCR 양성률이 임상양상과 잘 일치하였다.

따라서 EBV 감염의 정확한 진단을 위해서는 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG 모두를 포함한 EBV 항체 panel검사가 필수적이고, 이들 혈청학적 검사법으로는 정확한 상태를 측정하기 어려운 이식환자군 및 면역결핍환자군에서나, 면역기능이 정상인 대상군에서도 EBV 감염의 확진이나 예후 판정을 위하여는, EBV PCR법이 필요할 것으로 생각되었다.

요 약

배경 : EBV 감염 진단에 가장 많이 사용되고 있는 방법은 효소면역법을 이용한 특이항체검사법이며 최근에는 유전자제조합 항원을 이용하여 민감도와 특이도가 많이 향상되었다. 그러나 EA-IgM의 위양성률이 높으며, 면역억제환자, 면역결핍환자, 면역글로불린을 투여받은 환자 등에서는 검사결과의 신뢰도가 떨어진다. 단점이 있어 정확한 EBV 감염 진단에 어려움이 많은 현실이다.

방법 : 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 EBV Ab panel검사가 의뢰된 환자 944명을 대상으로 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG를 포함한 특이항체검사법을 시행하였고, 이 중 151명에 대해서는 중합효소연쇄반응법을 동시에 시행하였다. 결과는 흡광도치를 기준으로 EBV 감염의 stage를 9가지로 구분하여 해석하였다. 중합효소연쇄반응은 환자의 말초혈액으로부터 단핵구를 분리하여 이로부터 DNA를 추출하였고 EBNA 2 region을 시발체로 사용하여 증폭시켰다.

결과 : 대상군 944명에 대한 특이항체 panel 검사 결과는 seronegative가 9.9%였다. 소아환자군에서는 seronegative와 primary infection이 가장 흔했고 성인환자군에서는 past infection, 중환자실 및 이식환자군에서는 reactivation의 빈도가 높았다. 또한 EBNA-IgG 음성이 20.3%에서 관찰되었는데, 이러한 경우는 3가지 panel 항목 모두를 검사하지 않고는 EBV 감염의 정확한 병기의 판독이 불가능하였다. PCR은 총 35.8%의 양성률을 보였고 이 중 제1형이 55.6%, 제2형이 20.4%, 제1형과 제2형의 동시감염이 24.1%로 나타났다. Seronegative에서는 모두 PCR 음성이었으며 primary infection과 reactivation일 때의 PCR 양성률이 41.7%, 43.5%로 높았다.

결론 : 특이항체 panel 검사와 PCR은 서로 우수한 상관관계를 보였다. 정확한 EBV 감염 진단을 위해서는 EA-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG 모두를 포함한 EBV panel검사가 시행되어야

할 것이고, 혈청학적 검사법만으로 정확한 상태를 측정하기 어려운 이식환자군 및 면역결핍환자군, 또 면역기능이 정상인 대상군에서도 EBV 감염의 확진이나 예후 판정을 위해서는 EBV PCR법이 필요할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. *Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet* 1964; 1: 702-3.
2. Jenson HB. *Infectious mononucleosis. In: Jenson HB, Baltimore RS, eds. Pediatric infectious diseases: principles and practice. 1st ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1995: 565-76.*
3. Gaffey MJ and Weiss LM. *Association of Epstein-Barr virus with human neoplasia. Pathol Ann* 1992; 27: 55-74.
4. Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, et al. *Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral 'hairy' leukoplakia, an AIDS-associated lesion. N Engl J Med* 1985; 312: 1564-71.
5. Fox RI, Pearson G, Vaughan JH. *Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. J Immunol* 1986; 137: 3162-8.
6. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, et al. *Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. Lancet* 1990; 335: 128-30.
7. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. *Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. Ann Intern Med* 1993; 118: 45-58.
8. Okano M. *Epstein-Barr virus infection and its role in the expanding spectrum of human diseases. Acta Paediatr* 1998; 87: 11-8.
9. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. *U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7632-6.
10. Kieff E. *Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, et al. eds. Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 2343-96.*
11. Adldinger HK, Delius H, Freese UK, Clarke J, Bornkamm GW. *A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. Virology* 1985; 141: 221-34.
12. Zimmer U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, et al. *Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. Virology* 1986; 154: 56-66.
13. Young LS, Yao QY, Rooney CM, Sculley TB, Moss DJ, Rupani H, et al. *New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. J Gen Virol* 1987; 68: 2853-62.
14. Telenti A, Uehlinger DE, Marchesi F, Germann D, Malinverni R, Matter L. *Epstein-Barr virus infection in HIV-positive patients. Eur J*

- Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12: 601-9.
15. Yao QY, Tierney RJ, Carter DC, Duker D, Cooper GM, Ellis C, et al. Frequency of multiple Epstein-Barr virus infections in T-cell immunocompromised individuals. *J Virol* 1996; 70: 4884-94.
 16. Sumaya CV and Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985; 75: 1011-9.
 17. Hrisoho MG, Hinderer W, Schickel HN, Horn J, Vornhagen R, Sonneborn HH, et al. Serodiagnosis of infectious mononucleosis by using recombinant Epstein-Barr virus antigens and enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2305-11.
 18. 이창훈, 전혜선, 김현숙, 송경순. EBV-IgM, EA-IgG, EBNA-IgG 항체 동시검사에 의한 Epstein-Barr virus 감염의 혈청학적 진단. 임상병리학과 정도관리 1992; 14: 313-6.
 19. 이미경, 김현숙, 이창훈, 송경순, 권오현. 재조합항원을 이용한 세가지 Epstein-Barr virus 항체 panel 검사의 임상적 유용성. 임상병리학과 정도관리 1993; 15: 215-22.
 20. Telenti A. PCR detection and typing of Epstein-Barr virus. In: Persing DH, Smith TF, et al. White TJ, eds. *Diagnostic molecular microbiology*. 1st ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1993: 344-9.
 21. Haque T and Crawford DH. PCR amplification is more sensitive than tissue culture methods for Epstein-Barr virus detection in clinical material. *J Gen Virol* 1997; 78: 3357-60.
 22. Bai X, Hosler G, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem* 1997; 43: 1843-9.
 23. Jenson HB, Ench Y, Sumaya CV. Epstein-Barr virus. In: Rose NR, Conway de Macario E, et al. eds. *Manual of clinical laboratory immunology*. 5th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1997: 634-43.
 24. Hinderer W, Nebel-Schickel H, Horn J, Vornhagen R, Wenger-Suss R, Sonnenborn HH. The Biotest Anti-EBV recombinant ELISA system: recent studies, progress in interpretation, and future trends. *Biotest Bull* 1993; 5: 33-46.
 25. Grazi G, Balistreri M, Schito GC. Recombinant antigens in the serodiagnosis of EBV-infections. *Biotest Bull* 1993; 5: 47-50.
 26. 김현숙, 이미경, 김윤정, 권오현, 이삼열. 소아과 환자의 혈청내 Epstein-Barr virus 항체 양성을. 대한임상병리학회지 1990; 10: 71-5.
 27. 임성희, 송경순, 이삼열. Anti-VCA IgM 항체 검사에 양성을 보인 Epstein-Barr virus 감염 9예. 대한임상병리학회지 1990; 10: 129-33.
 28. Haque T, Thomas JA, Falk KI, Parrat R, Hunt BJ, Yacoub M, et al. Transmission of donor Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted organs causes lymphoproliferative disease in EBV-seronegative recipients. *J Gen Virol* 1996; 77: 1169-72.
 29. Ho M, Miller G, Atchison RW. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 1985; 152: 876-86.
 30. Basgoz N and Preiksaitis J. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect Dis Clin North Am* 1995; 9: 901-23.
 31. Delmonico FL and Snydman DR. Organ donor screening for infectious diseases: review of practice and implications for transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 603-10.
 32. Fishman JA and Rubin RH. Medical progress: infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-51.
 33. Park CS, Juhng SW, Brigati DJ, Montone KT. Analysis of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease: experience of a single university hospital in Korea. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 412-7.
 34. Huh J, Park C, Juhng S, Kim CE, Poppema S, Kim C. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with Epstein-Barr virus infection. *Cancer* 1996; 77: 949-55.
 35. Kim IS, Park CK, Kim H, Lee YY, Ahn MI, Lee WS. Epstein-Barr virus associated hemophagocytic syndrome: a case report. *Korean J Med Sci* 1997; 12: 447-51.
 36. Lee SS, Jang JJ, Cho KJ, Khang SK, Kim CW. Epstein-Barr virus-associated primary gastrointestinal lymphoma in non-immunocompromised patients in Korea. *Histopathology* 1997; 30: 234-42.
 37. Apolloni A and Sculley TB. Detection of A-type and B-type Epstein-Barr virus in throat washings and lymphocytes. *Virology* 1994; 202: 978-81.
 38. Tagliati M and Morgello S. Analysis of Epstein-Barr virus subtypes in AIDS-related primary CNS lymphoma. *Ann Neurol* 1997; 42: 431.
 39. Yao QY, Croom-Carter DSG, Tierney RJ, Habeshaw G, Wilde JT, Hill FGH, et al. Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell immunocompromised hemophilic cohort. *J Virol* 1998; 72: 4352-63.
 40. Rogers BB, Sommerauer J, Quan A, Dawson DB, Krisher K, Timmons CF, et al. EBV PCR and serology in patients with posttransplant lymphoproliferative disorder. *Lab Invest* 1997; 76: 6.
 41. Borisch B, Finke J, Hennig I, Delacretaz F, Schneider J, Heitz PU, et al. Distribution and localization of Epstein-Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue of HIV-positive patients. *J Pathol* 1992; 168: 229-36.
 42. Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987; 61: 1310-7.
 43. Elenitoba JKSI, Zarate OA, Meneses A, Krenacs L, Kingma DW, Raffeld M, et al. EBV strain type and LMP-1 oncogene deletions in nasal T/NK-cell lymphomas from Mexico. *Lab Invest* 1997; 76: 124.
 44. Lin JC, Lin SC, De BK, Chan WP, Evatt BL. Precision of genotyping of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction using three gene loci (EBNA-2, EBNA-3C, and EBER): predominance of type A virus associated with Hodgkin's disease. *Blood* 1993; 81: 3372-81.
 45. Frank D, Cesarman E, Liu YF, Michler RE, Knowles DM. Posttrans-

- plantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. Blood 1995; 85: 1396-403.*
46. Boyle MJ, Vasak E, Tschuchnigg M, Turner JJ, Sculley T, Penny R, et al. Subtypes of Epstein-Barr virus (EBV) in Hodgkin's disease: association between B-type EBV and immunocompromise. *Blood 1993; 81: 468-74.*
47. Boyle MJ, Sewell WA, Sculley TB, Apolloni A, Turner JJ, Swanson CE, et al. Subtypes of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood 1991; 78: 3004-11.*
48. Borisch B, Hennig I, Laeng RH, Waelti ER, Kraft R, Laissue J. Association of the subtype 2 of the Epstein-Barr virus with T-cell non-Hodgkin's lymphoma of the midline granuloma type. *Blood 1993; 82: 858-64.*
49. Abdel-Hamid M, Chen JJ, Constantine N, Massoud M, Raab-Traub N. EBV strain variation: geographical distribution and relation to disease state. *Virology 1992; 190: 168-75.*
50. Gratama JW and Erberg I. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv Cancer Res 1995; 67: 197-255.*
51. Jenkins PJ and Farrell PJ. Are particular Epstein-Barr virus strains linked to disease? *Semin Cancer Biol 1996; 7: 209-15.*
52. Crompton CH, Cheung RK, Donjon C, Miyazaki I, Feinmesser R, Hebert D, et al. Epstein-Barr virus surveillance after renal transplantation. *Transplantation 1994; 57: 1182-9.*
53. Viero RM, First MR, Cavallo T. Detection of Epstein-Barr virus message in renal allografts. *Transplantation 1996; 61: 321-3.*
54. Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C. Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood 1994; 83: 2715-22.*
55. Rogers BB, Conlin C, Timmons CF, Dawson DB, Krisher K, Andrews WS. Epstein-Barr virus PCR correlated with viral histology and serology in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Pathol Lab Med 1997; 17: 391-400.*
56. Lucas KG, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, et al. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood 1998; 91: 3654-61.*
57. Vajro P, Lucariello S, Migliaro F, Iorio R, Quinto I, Vegnente A, et al. Monitoring of Viremia and replicative status of Epstein-Barr virus is useful for early diagnosis and modulation of therapy of lymphoproliferative disease in liver-transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 26: 585.*
58. Randhawa PS, Demetris AJ, Nalesnik MA. Differentiation of renal Epstein-Barr virus (EBV) associated posttransplant lymphoproliferative disease (PTLD) from severe acute rejection (AR), using the Banff schema. *Lab Invest 1996; 74: 168.*
59. Montone KT and Tomaszewski JE. Posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) following renal transplantation: frequent presentation in the allograft. *Lab Invest 1998; 78: 136.*
60. Wu CL, Zukerberg LR, Zagachin L, Wang RJ, Ferry JA, Bhan A, et al. EBV latent infection distinguishes post-transplantation lymphoproliferative disorders from acute cellular rejection. *Lab Invest 1998; 78: 142.*
61. McDiarmid S, Kim G, Jordan S, Goss J, Maxfield A, Satow B, et al. Pre-emptive treatment with intravenous ganciclovir and serial PCR monitoring for EBV reduces the risk of LPD in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation 1998; 1: 181.*