

EBV infection in immunocompetent patient: problems and solutions in serological diagnosis

Massimo De Paschale, Pierangelo Clerici

U.O.C. Microbiologia, A.O. Ospedale Civile di Legnano

Key words: EBV infection; Serology, Immunoblotting, Avidity IgG, EBV-DNA

Diagnosi sierologica dell'infezione da EBV nel paziente immunocompetente: problemi e soluzioni

SUMMARY

Serological tests for antibodies against specific EBV antigens are commonly used to define the state of the infection as well as for differential diagnosis with the other agents responsible for mononucleosis syndrome. The use of only three parameters (VCA IgG and IgM and IgG EBNA-I) is normally enough to distinguish acute and past infection in immunocompetent patients: the presence of VCA IgG and IgM without EBNA-I IgG indicates acute infection, whereas the presence of VCA IgG and EBNA-I IgG without VCA IgM is typical of past infection. These profiles (beyond the negative profile for all three markers indicating the absence of infection) cover the vast majority of situations that can be found in the routine laboratory. In a minority of cases, however, the serological pattern may sometimes be difficult to interpret: presence of VCA IgG without either VCA IgM or EBNA-I IgG, simultaneous presence of VCA IgG, VCA IgM and EBNA-I IgG, presence of EBNA-I IgG without either VCA IgM or VCA-I IgG. In order to interpret these serological patterns correctly, it is necessary to use other laboratory tests: VCA IgG avidity, immunoblotting for EBV IgG and IgMV, or a search for heterophile antibodies, anti-EA antibodies or viral genome by means of gene amplification techniques.

INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr virus (EBV) o human herpes virus 4 è ubiquitario e circa il 90% della popolazione adulta nel mondo presenta anticorpi diretti contro il virus (91). Nei soggetti immunocompetenti, l'infezione acuta è generalmente asintomatica nei bambini, mentre si manifesta come mononucleosi nel 30-50% degli adolescenti e adulti (65, 100). EBV è associato, soprattutto negli immunocompromessi, con vari disordini linfoproliferativi, e con alcune patologie neoplastiche tra cui il linfoma di Burkitt e il carcinoma nasofaringeo.

Come gli altri virus erpetici, EBV ha un ciclo produttivo litico e una fase latente. Durante il ciclo litico le proteine regolatorie virali, appartenenti al gruppo degli Immediately Early Antigen (IEA) e Early Antigen (EA), sono sintetizzate per permettere la produzione del DNA virale (EBV-DNA), delle proteine strutturali del virione (VCA = Viral Capside Antigen) e delle proteine di membrana (MA). Il ciclo litico porta alla distruzione delle cellule infettate e alla produzione di particelle virali, ma EBV può anche persistere nella cellula ospite senza una completa produzione virale, autoreplicandosi come acidi nucleici extracromosomiali (episomi) in seguito all'espressione di pochi e selezionati geni virali (91). In fase di latenza si può avere una ripresa del ciclo litico.

Si pensa che la riattivazione avvenga quando c'è una ricircolarizzazione delle cellule B della memoria infettate nel tessuto linfoide (107). Stimolate dai loro naturali antigeni, queste si differenziano in plasmacellule con inizio del ciclo replicativo e rilascio finale di virioni infettivi (34). La risposta umorale include anticorpi contro gli antigeni sia del ciclo litico che della fase di latenza. Durante la fase attiva dell'infezione primaria, sono prodotti anticorpi contro circa 100 differenti antigeni e durante la fase latente contro 10 ulteriori proteine. Pochi, sono però gli anticorpi ampiamente studiati e utilizzati a fini diagnostici. Gli anticorpi IgG anti-EA riflettono due pattern originariamente osservati con *test* in immunofluorescenza in base alla distribuzione all'interno delle cellule linfocitarie infette e alla loro denaturazione differenziale con procedure di fissazione ed enzimi proteolitici: diffuso, presente nel citoplasma e nel nucleo (D) o ristretto, solo nel citoplasma (R). Sebbene non sempre presenti, gli anti-EA (D) IgG aumentano nelle prime 3-4 settimane per non essere più rilevabili dopo 3-4 mesi (circa l'85% dei pazienti con infezione acuta è positivo fino a tre mesi dopo l'inizio dei sintomi) (8, 64), ma in alcuni casi possono perdurare a lungo ed essere rilevabili ancora dopo anni dall'infezione primaria (8). Circa il 20-30% dei soggetti sani con infezione pregressa da EBV presentano EA (D)

Corresponding author: Massimo De Paschale

U.O.C. Microbiologia, A.O. Ospedale Civile di Legnano

Via Giovanni Paolo II - 20025 Legnano (Mi), Italy - Tel.: +39(0)331449319 - Fax: +39(0)331449758

E-mail: massimo.depaschale@ao-legnano.it

IgG (8, 65, 116). Alti titoli sono stati riscontrati anche durante le riattivazioni (40) e nei pazienti con carcinoma nasofaringeo (14) dove sono presenti anche alti titoli di anti-VCA IgA e anti-EA IgA (51). Gli anti-EA (R) IgG possono rimanere elevati fino a due anni ed evidenziabili nei casi protratti di malattia dopo la scomparsa degli anti-EA (D) IgG (10). Gli anti-EA (R) IgG sono stati riscontrati nei bambini sotto i 2 anni con infezione silente, nei linfoma di Burkitt, ma anche, a basso titolo, nelle forme pregresse (51). Nei pazienti immunocompromessi e nelle riattivazioni si possono osservare alti livelli di anti-EA(D) e/o EA(R) IgG (10).

Gli anticorpi diretti contro l'antigene capsidico (VCA) di classe IgG generalmente compaiono all'inizio dei sintomi clinici dell'infezione acuta, e rimangono positivi per tutta la vita (95), mentre gli anticorpi di classe IgM usualmente compaiono allo stesso tempo degli anti-VCA IgG e scompaiono entro poche settimane (9, 21, 27, 62, 81, 96), ma possono persistere anche per diversi mesi (21). Non sempre gli anti-VCA IgM sono stati trovati positivi nell'infezione primaria sia nei bambini che negli adulti (95, 104).

Gli anticorpi anti-EBNA-2 IgG compaiono presto e possono essere presenti in circa il 30% dei pazienti al momento della malattia (8, 65), mentre gli anti-EBNA-1 IgG non sono generalmente rilevabili nelle prime 3-4 settimane dopo l'inizio dei sintomi clinici (39, 95) e sono quindi indicativi di un'infezione pregressa; inoltre gli anti-EBNA-1 IgG possono rimanere negativi o a basso titolo nella maggioranza delle infezioni croniche e nei pazienti immunodepressi (77).

La ricerca di questi anticorpi è un mezzo per definire lo stato dell'infezione e può essere usata per la diagnosi differenziale. Una sindrome mononucleosica, infatti, può essere causata da altri patogeni come il virus della rosolia, della parotite, HHV 6, CMV, HIV, *Toxoplasma gondii*, etc. (22, 65).

Con solo tre parametri: anti-VCA IgG, anti-VCA IgM e anti-EBNA-1 IgG è generalmente semplice distinguere tra infezione acuta e pregressa nel paziente immunocompetente (31, 41) dal momento che la presenza di anti-VCA IgG e anti-VCA IgM in assenza di anti-EBNA-1 IgG è indicativo di infezione acuta, mentre la presenza di anti-VCA IgG e anti-EBNA-1 IgG in assenza di anti-VCA IgM è tipica dell'infezione pregressa (Tabella 1). In una minoranza di casi, però, possono comparire dei profili diversi che possono creare dubbi diagnostici: presenza di anti-VCA IgG in assenza di anti-VCA IgM e anti-EBNA-1 IgG, simultanea presenza di anti-VCA IgG, anti-VCA IgM e anti-EBNA-1 IgG, presenza di anti-EBNA-1 IgG in assenza di anti-VCA IgG e anti-VCA

IgM (Tabella 1). In tali casi, in aggiunta al *follow up* del paziente con lo scopo di valutare eventuali variazioni nel profilo anticorpale, è utile eseguire altri *test* di laboratorio (41).

METODI DI LABORATORIO

Vari *test* di laboratorio sono stati usati per diagnosticare l'infezione da EBV. Oltre a *test* per l'identificazione di altri parametri utili per la diagnosi (leucocitosi, linfocitosi con presenza di linfociti atipici, valori alterati della funzionalità epatica, etc.), i *test* per la ricerca degli anticorpi includono *test* per la determinazione di anticorpi eterofili non specifici e *test* per anticorpi specifici contro l'EBV cui possono essere aggiunti metodi di ricerca molecolare per la ricerca di EBV-DNA.

Anticorpi eterofili

Gli anticorpi eterofili sono anticorpi che agglutinano cellule di altre specie animali, principalmente associati alla mononucleosi da EBV, ma rilevati, seppur raramente, anche in altre malattie (84). Raggiungono il picco in 2-5 settimane dall'inizio dei sintomi per poi declinare rapidamente. Raramente possono persistere per 6-12 mesi (21, 106). L'85-90% degli adolescenti o degli adulti risulta positivo in corso di infezione da EBV: nella prima settimana di malattia la positività raggiunge circa il 50%, mentre nella seconda e terza arriva al 60-90% (10). Nei bambini di 2-5 anni, invece, solo il 50% risulta globalmente positivo in corso di infezione e sotto i due anni solo il 10-30% (65). Anche i soggetti anziani con mononucleosi acuta possono essere negativi. In questi gruppi, quindi, il livello di risultati falsamente negativi può essere alto, mentre i falsi positivi sono stati trovati solo nel 2-3% dei pazienti con patologie autoimmuni (65). Nonostante questi limiti, la ricerca degli anticorpi eterofili può essere d'aiuto in caso d'infezione primaria soprattutto per la sua semplicità. I *test* normalmente utilizzati per la ricerca degli anticorpi eterofili in *routine* sono *test* di agglutinazione che utilizzano come antigeni, globuli rossi di varie specie animali (es. pecora, capra, cavallo) o particelle di lattice con adesivi antigeni di bovino specifici per gli anticorpi eterofili (Monospot assays). Recentemente sono stati proposti anche monodosaggi multiplex a flusso (MFI) che presentano una maggior sensibilità nelle infezioni acute (60). Dato il livello di risultati falsamente negativi, in caso di negatività, è necessaria la ricerca di anticorpi specifici (65, 106).

Anticorpi EBV specifici

I *test* specifici per gli anticorpi anti-EBV usano differenti substrati o antigeni e diverse tecnologie.

I metodi comunemente usati per lo *screening* di *routine* degli anticorpi anti-EA IgG, EBNA-1 IgG, VCA IgG e VCA IgM sono in immunofluorescenza (IFA) o immunoenzimatica (EIA), con le versioni ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e CLIA (chemiluminescence immunoassay) o MFI (multiplex flow immunoassay). I *test* IFA normalmente utilizzano linee cellulari B trasformate da EBV derivate da pazienti con linfoma da Burkitt (per es.: linee cellulari P3HR-1 o le linee Raji) (8, 38, 43, 65, 68, 89), mentre i *test* EIA usano proteine native purificate o ricombinanti, proteine di fusione o peptidi sintetici rappresentanti sia proteine complete che frammenti delle proteine codificate dai geni di EBV (31, 106). Il tipo e la preparazione degli antigeni utilizzati sono probabilmente responsabili delle differenze riscontrate nei risultati con i vari *test* (31) sia in termini di sensibilità che di specificità (12, 16). Gli ultimi CLIA, inoltre, usando peptidi sintetici con differenti *cut off* per gli anti-VCA IgM e anti-EBNA-1 IgG possono discriminare meglio lo stadio dell'infezione (29) e, in caso di campioni simultaneamente anti-EBNA-1 IgG, anti-VCA IgG e anti-VCA IgM positivi, possono aiutare nel distinguere tra infezione recente (in fase transitoria) e infezione pregressa o riattivazione (29, 73).

Immunoblotting

Differenti *immunoblotting* sono stati sviluppati per confermare i *test* di *screening*. Sono stati prodotti sia utilizzando lisati virali (usando cellule EBV trasformate) che antigeni ricombinanti (*line blot*) (96). Gli ultimi sono considerati non influenzati da anticorpi contro materiale cellulare che sono spesso ritrovati in pazienti con mononucleosi (8, 30). Alcuni *line blot* usano adesi alla fase solida antigeni ricombinanti EBNA-1 (p72), VCA (p18 and p23), EA (p54 e p138), MA (gp 350/250) e nei più recenti anche IEA (ZEBRA). È stato riportato che sieri di pazienti con infezione acuta mostrano anti-p23 IgG, anti-p54 IgG e anti-p138 IgG e non anti-p72 IgG, mentre sieri da pazienti con infezione pregressa mostrano anti-p23 IgG, anti-p72 IgG e anti-p18 IgG (8).

Studi di cinetica hanno dimostrato che una forte risposta in anti-p72 IgG non compare prima del 20° giorno dall'inizio della malattia. Dal momento che gli anti-p72 IgG e gli anti-p18 IgG non sono rilevabili nel siero dei pazienti con infezione acuta ma sono presenti nel siero di pazienti con infezione pregressa (8), gli anti-p18 IgG possono essere considerati equivalenti, dal punto di vista del significato, agli anti-EBNA-1 IgG. Inoltre gli anti-p18 IgG non sono persi in caso di immunosoppressione (8).

Sono stati anche sviluppati *immunoblotting* per le

IgM con cui anticorpi anti-VCA IgM possono essere rilevati nel siero di pazienti con infezione acuta, ma non anti-p72 IgM (8). Questo tipo di *immunoblotting* può quindi essere utile per confermare la specificità degli anti-VCA IgM rilevati ai *test* di *screening*.

Avidità delle IgG

Il *test* per l'avidità delle IgG permette di valutare il grado di maturazione delle IgG che è in funzione del tempo dall'esordio dell'infezione. L'avidità è bassa all'inizio dell'infezione acuta, ma diventa più alta quando la risposta immune matura (47, 61, 113). La cinetica della maturazione, per esempio, degli anti-VCA IgG dura alcune settimane e in alcuni casi è stato riportato che può arrivare fino a tre mesi dopo i sintomi (4, 15). L'avidità può essere misurata usando EIA, IFA o *immunoblotting* (4, 8, 97). Due aliquote dello stesso campione sono testate in parallelo per la ricerca degli anticorpi IgG. Una aliquota non è trattata mentre l'altra è trattata con sostanze dissocianti gli anticorpi dagli antigeni (generalmente urea 8 M). Tale dissociazione dipende dal grado di avidità dell'anticorpo verso l'antigene e quindi dal grado di maturazione. Il rapporto tra campione trattato e non trattato definisce il grado di avidità. La ricerca dell'avidità può, quindi, essere usata per stimare il tempo in cui c'è stata un'infezione primaria e può differenziare un'infezione acuta da una pregressa (4, 8, 32, 97, 117). I dati riportati in letteratura dipendono dall'anticorpo esaminato e, quindi, dal tipo di antigene che è utilizzato per il *test*. Oltre a usare un mix di antigeni possono essere utilizzati VCA *in toto* o specifici (p23 o p18), IEA (ZEBRA), EA (p138, p54) o EBNA-1 (p72). A seconda della cinetica dei vari anticorpi l'avidità può essere diversa (4, 112). Per esempio è stato riportato che per gli anti-VCA IgG, campioni raccolti nelle prime 12 settimane dall'inizio dei sintomi presentano una bassa avidità, indice di recente infezione (92). Proseguendo nel tempo, l'avidità degli anti-VCA IgG può essere *borderline* o alta quando l'avidità degli anti-EA IgG è ancora bassa (4). Utilizzando l'*immunoblotting* che ha adeso alla fase solida vari antigeni, si può avere una visione simultanea dell'avidità dei vari anticorpi (Tabella 2). Con questo *test*, però, la maturazione degli anticorpi anti-IEA e EA (BZLF1, p138 e p54) non sembrano fornire un'indicazione dello stato immunitario potendosi formare anticorpi a bassa avidità anche durante la riattivazione. Di conseguenza la ditta produttrice sottolinea che la sola riduzione delle intensità delle bande EA e IEA non è un indice di infezione recente (88). I limiti per i *test* di avidità sono la maturazione individuale degli anticorpi e la non possibilità

d'impiego nei neonati data la presenza di anticorpi materni.

Biologia Molecolare

Una gran varietà di metodi, tecniche e protocolli sono stati usati in passato per determinare l'EBV-DNA e misurare la carica virale (dot blotting, Southern blotting, PCR e ibridazione *in situ*) (56, 69, 70, 101), ma studi più recenti indicano che la PCR in *real-time* è la metodica più utile per definire lo stato dell'infezione, specialmente nella diagnosi differenziale di malattie ematologiche, nei pazienti immunocompromessi (13, 43, 71) o a rischio di sviluppare disordini EBV-correlati (43). Non c'è ancora, però, consenso sul metodo ottimale da usare, sul materiale da utilizzare, sulle unità di misura o sui livelli quantitativi per la prognosi anche se programmi di *consensus* sono in atto per quanto riguarda i pazienti con disordini ematologici (17, 34, 37, 58, 87, 103). Ciò comporta che particolare attenzione occorre nel comparare i dati provenienti dai vari studi (72).

I virioni prodotti durante l'infezione primaria si diffondono nel sangue periferico (28, 94), nel quale è anche possibile determinare l'EBV-DNA libero o frammentato derivato da cellule apoptotiche (94). Anche le cellule-B trasformate in fase latente passano nel torrente circolatorio. EBV-DNA può, quindi, essere determinato sia nel siero o plasma che nelle cellule mononucleate del sangue (PBMC) (3).

Nel paziente immunocompetente con infezione primaria EBV-DNA è frequentemente rilevato nel sangue intero (sia nei PBMC che nel plasma/siero) entro 14 giorni dall'inizio dei sintomi (7, 11, 57, 86, 118).

Dopo l'inizio della risposta immunitaria, la carica virale diminuisce lentamente nei PBMC ma rapidamente nel plasma/siero diventando in questa frazione non determinabile in tre-quattro settimane (6, 24, 54), mentre le cellule della memoria con EBV latente possono rimanere a lungo nel sangue. Generalmente il sangue di un portatore sano contiene da 1 a 50 copie di EBV-DNA per milione di cellule bianche mentre nel plasma e siero EBV-DNA è quasi sempre non rilevabile (5, 28, 33, 36, 75, 118).

Di conseguenza la presenza di EBV-DNA nel plasma/siero è considerata segno di infezione primaria (55) o riattivazione e la carica virale correla con la gravità della malattia (6, 57, 118). Bisogna ricordare, però, che esistono variazioni individuali in quanto la cinetica può variare da paziente a paziente con possibili rialzi della carica virale dopo un iniziale declino e in alcuni casi si può arrivare fino ad un anno o più per avere un livello stabilmente basso. Nel paziente immunocompe-

tente con infezione acuta, però, non è in generale necessario ricorrere alla ricerca dell'EBV-DNA, in quanto è sufficiente la sierologia, a meno che non ci siano casi clinicamente suggestivi con sierologia negativa o dubbia (46, 79, 86).

La ricerca di EBV-DNA quantitativo diventa particolarmente importante nei soggetti immunocompromessi che non hanno una risposta umorale completa e in pazienti che hanno ricevuto trasfusioni o immunoglobuline che confondono i test sierologici (51) nonché nei tumori EBV associati (3, 49, 55). È stato riportato che i pazienti immunocompromessi hanno livelli virali di base più alti rispetto ai portatori sani, e decadono con la terapia (23, 102). Il materiale più adatto per la ricerca di EBV-DNA è differente a seconda della malattia (55). Per esempio nei disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) le cellule B trasformate proliferano attivamente nel tessuto linfoide e si diffondono nel torrente circolatorio.

La maggior parte di EBV-DNA sembra essere associata alla frazione cellulare, ma una parte è presente anche come EBV-DNA libero nel siero/plasma. Di conseguenza il sangue intero è considerato il materiale preferibile, i PBMC sono considerati un materiale desiderabile, mentre è ancora dibattuto l'uso del plasma/siero (55).

Nel linfoma di Hodgkin EBV correlato, le cellule tumorali con infezione latente raramente migrano nel circolo sanguigno dove si trovano in basso numero, mentre EBV-DNA si trova soprattutto nel siero o plasma come DNA nudo o episomiale.

Di conseguenza il plasma/siero sembra essere il miglior materiale per la ricerca del genoma virale, mentre la ricerca nei PBMC non sembra essere raccomandata (55).

PROFILO "ANTI-VCA IgM ISOLATO"

Gli anti-VCA IgM compaiono generalmente in contemporanea con gli anti-VCA IgG, ma possono essere rilevati in anticipo. Di conseguenza un profilo di anti-VCA IgM isolato è considerato comunemente un indice di infezione acuta in fase precoce. D'altra parte è consigliato valutare comunque la specificità del risultato, in quanto fattori interferenti (fattore reumatoide, autoanticorpi) o cross-reagenti (HCMV o parvovirus B19) possono rendere aspecifico il risultato (92).

La ricerca di questi fattori interferenti o cross-reagenti e l'esecuzione di un *immunoblotting* per le IgM possono essere d'aiuto come anche la determinazione di altri parametri di infezione acuta come gli anticorpi eterofili o la ricerca dell'HBV-DNA (79). Anche la ricerca degli anti-EA (D) IgG può aggiungere un dato utile in quanto circa l'85% dei pazienti con infezione acuta sono positivi per questi anticorpi fino a tre mesi dall'insor-

genza dei sintomi (8, 64).

PROFILO "ANTI-VCA IgG ISOLATO"

In alcuni casi gli anti-VCA IgM possono non essere prodotti o apparire 1-2 settimane dopo gli anti-VCA IgG, o per pochissimo tempo o in una tale bassa concentrazione da non essere rilevati dai *test* convenzionali (9, 44, 65, 95).

Inoltre circa il 5% dei pazienti non produce anti-EBNA-1 IgG dopo l'infezione da EBV (9, 53) o rimangono sotto il limite di rilevamento (53, 62) e, anche quando sono prodotti, possono essere persi nel tempo soprattutto, ma non solo, nei pazienti immunocompromessi (8, 9, 110).

Di conseguenza, un profilo anti-VCA IgG isolato può essere trovato sia in caso di infezione pregressa con perdita o non comparsa di anti-EBNA-1 IgG, sia in caso di infezione acuta con ritardata o precoce scomparsa di anti-VCA IgM.

Questo profilo può essere trovato in circa il 7% di una casistica routinaria di laboratorio e può rappresentare circa l'8% di tutti i soggetti con almeno un marcatore d'infezione da EBV e tende a diventare più frequente con l'avanzare dell'età (18).

Questi casi richiedono ulteriori approcci diagnostici (Tabella 3): *immunoblotting* per IgG, *test* per l'avidità degli anti-VCA IgG, ricerca del genoma virale, degli anticorpi eterofili, degli anti-EA (D) IgG (41), o una ripetizione del *test* dopo circa 30 giorni per identificare qualche cambiamento nel profilo anticorpale.

Tuttavia, quest'ultima opzione inevitabilmente ritarda la diagnosi fino al secondo prelievo. Inoltre, i medici curanti tendono ad evitare un secondo prelievo se i sintomi migliorano nel tempo, specialmente in caso di bambini nei quali il prelievo di sangue può essere vissuto in maniera traumatica. Di conseguenza un secondo prelievo viene eseguito solo su un piccolo numero di pazienti (18).

L'*immunoblotting* per le IgG permette l'interpretazione dei casi con anti-VCA IgG isolato (8). Alcuni *test* usano antigeni ricombinanti p72 (EBNA-1), p18 and p23 (VCA), p54 e p138 (EA) e gp 350/250 (MA). Poiché gli anti-p18 IgG sono prodotti tardivamente durante l'infezione da EBV, la presenza di anti-p18 IgG può essere considerata equivalente, come significato, alla presenza di anti-EBNA-1 IgG cioè di un'infezione pregressa, mentre la loro assenza indica un'infezione acuta. L'*immunoblotting* può distinguere i casi con perdita o non comparsa degli anti-EBNA-1 IgG (dove, invece, c'è una risposta in anti-p18 IgG) da quelli con negatività primaria degli anti-EBNA-1 IgG (infezione acuta) (8, 98). Applicando questa metodica a casi di anti-VCA IgG isolato è stato possibile identificare come infezione acuta il 20%

circa dei casi e infezione pregressa nel rimanente 80% (18).

Anche un *test* per l'avidità degli anti-VCA IgG può essere utilizzato con successo per distinguere fra infezione primaria e pregressa (32, 92), rispettivamente indicati da livelli bassi e alti di avidità: studi eseguiti su questi soggetti hanno riportato livelli di bassa avidità in circa la metà dei casi, e livelli elevati nella rimanente metà di soggetti con anti-VCA IgG isolato (7, 13).

Utilizzando *test* di avidità è importante avere a disposizione tutti i dati clinici temporali del paziente per poter interpretare al meglio i risultati ottenuti.

La rilevazione di EBV-DNA è stata indicata come particolarmente utile nel caso di infezioni sierologicamente indeterminate (7, 13, 79) dato che la presenza di EBV-DNA nel siero, plasma o sangue intero indica un'infezione primaria o una riattivazione (55). Alcuni studi hanno dimostrato che la presenza di EBV-DNA in pazienti con anti-VCA IgG isolato è generalmente associata ad un basso livello di avidità degli anti-VCA IgG (7, 13) soprattutto quando il campione viene prelevato nelle prime fasi di sospetta mononucleosi infettiva, anzi in alcuni studi è stato visto correlare meglio dell'avidità degli anti-VCA IgG (7). Nei casi di infezione pregressa diagnosticata sulla base di un elevato livello di avidità degli anti-VCA IgG, inoltre, nessun siero è stato trovato positivo per EBV-DNA (7).

La ricerca di anticorpi eterofili nei pazienti con un anti-VCA IgG isolato può essere utile se la ricerca risulta positiva (anche se in passato è stata riportata in alcuni casi la presenza di questi anticorpi fino a 6-12 mesi (21, 51, 106).

È stato visto che circa il 60% dei soggetti con anti-VCA IgG isolato con infezione acuta evidenziata all'*immunoblotting*, presenta anticorpi eterofili, contro nessuno di quelli con infezioni pregressa (18). Tuttavia, nulla può essere detto in caso di assenza di anticorpi eterofili (specialmente nei bambini di età inferiore ai 5 anni) e altri *test* devono essere utilizzati.

Una possibile alternativa è la ricerca di anti-EA (D) IgG. Circa l'85% dei pazienti con infezione acuta è positivo per anti-EA (D) IgG fino a tre mesi dall'insorgenza dei sintomi (8, 64), tuttavia, titoli elevati sono presenti durante la riattivazione di EBV (40) e possono anche essere trovati nel 20-30% dei soggetti sani con infezione pregressa (65, 116) oltre a pazienti con carcinoma nasofaringeo (14). Di conseguenza l'utilizzo di questi anticorpi a livello diagnostico è molto dibattuto in letteratura. In generale, la ricerca di anti-EA (D) IgG da sola non consente di identificare lo stadio della malattia (41, 59), ma la combinazione di questi

anticorpi con altri parametri può essere utile nella diagnosi di laboratorio (42). Nei pazienti con anti-VCA IgG isolato con infezione pregressa, infatti, il 12% è risultato anti-EA(D) IgG positivo a fronte di un 90% di soggetti con infezione acuta (19).

Profilo con presenza contemporanea di anti-EBNA-1 IGG, anti-VCA IGG, anti-VCA IGM

Gli anti-VCA IgM possono persistere per diversi mesi dopo l'infezione acuta (36), e possono anche ricomparire durante la riattivazione da EBV (96, 105). Di conseguenza, tutti e tre i marcatori anti-EBNA-1 IgG, anti-VCA IgG e anti-VCA IgM possono essere contemporaneamente presenti in pazienti con infezione primaria da EBV se gli anti-VCA IgM persistono e gli anti-EBNA-1 IgG sono già stati prodotti (fase che è stata variamente definita come "infezione recente", "fase transitoria" o "tardiva infezione primaria"), o in quelli con riattivazione (31).

La riattivazione è comunque relativamente rara e spesso di breve durata nei soggetti immunocompetenti, e generalmente è considerata di nessuna rilevanza clinica (78, 83), tuttavia, nei pazienti immunodepressi, può essere causa di gravi complicazioni.

Questo *pattern* sierologico è infrequente (circa il 5% della normale *routine* di laboratorio) (18), e ulteriori *test* diagnostici sono necessari per distinguere tra infezione recente e riattivazione (tabella 4).

Prima di tutto, è importante verificare la specificità degli anti-VCA IgM dato che possono esserci dei risultati falsamente positivi (73, 74, 111, 114) in corso d'infezione da altri patogeni: HCMV, Eritrovirus (parvovirus) B19, *Toxoplasma gondii*, epatite A, HIV (1, 25, 50, 80, 82, 90, 109). È stato dimostrato che l'infezione primaria da HCMV provoca spesso un'ulteriore risposta anticorpale IgM anti-EBV (48).

Inoltre, risposte anticorpali cross-reattive nei confronti di epitopi conservati sono ben noti tra gli herpes virus, come l'epitopo glicina-alanina condivisa da EBV e HCMV (90).

In alcuni studi fino a circa il 50% di anti-VCA IgM in pazienti con infezione pregressa può essere dovuta ad una reattività aspecifica (92), di conseguenza la positività degli anti-VCA IgM dovrebbe essere confermata per esempio da un *immunoblotting* per EBV IgM (50).

È anche possibile effettuare *test* per evidenziare la cross-reattività o la policlonalità delle IgM, specialmente con HCMV e parvovirus B19 (79) e in alcune situazioni particolari anche la ricerca di DNA HCMV o di parvovirus B19 può dirimere alcuni dubbi (79).

Inoltre, dal momento che reazioni falsamente

positive possono verificarsi anche a causa della presenza di autoanticorpi o fattore reumatoide, la ricerca di questi interferenti può risultare utile.

Va, però ricordato che agglutinine fredde, fattore reumatoide e autoanticorpi possono essere trovati per un breve periodo in corso di mononucleosi da EBV dovuti ad un'attivazione policlonale e delle cellule-B (93), di conseguenza la presenza di fattore reumatoide non significa automaticamente una falsa positività degli anti-VCA IgM. Infine, anche la positività degli anti-EBNA-1 IgG può essere dovuta ad una reattività aspecifica che può essere evidenziata con *test* per le IgG in *immunoblotting* (50).

D'altra parte, i *test* EIA per anti-EBNA-1 IgG recentemente messi a punto sulla base di peptidi ricombinanti o sintetici possono essere più sensibili rispetto ai *test* usati in precedenza e consentire la loro individuazione precocemente nel corso di infezione primaria da EBV (50).

Una volta accertata la specificità dei risultati ottenuti per poter ulteriormente comprendere questo profilo anticorpale occorrono ulteriori approcci diagnostici (Tabella 4).

Oltre a ripetere il *test* dopo un congruo periodo di tempo, al fine di individuare eventuali cambiamenti nel profilo anticorpale, il *test* di avidità degli anti-VCA IgG si è dimostrato particolarmente utile (4, 15, 32).

Alcuni studi hanno rilevato, infatti, che meno della metà dei pazienti immunocompetenti con questo profilo anticorpale e bassa avidità aveva un'infezione primaria, mentre circa il 20% o meno aveva una riattivazione probabilmente insignificante dal punto di vista clinico (50, 105).

Utilizzando i *test* per l'avidità delle IgG è importante conoscere da quanto tempo dall'esordio dei sintomi il prelievo è stato effettuato per poter valutare correttamente i risultati ottenuti in relazione al tempo di maturazione dei vari anticorpi. Controverso è l'uso della ricerca degli anticorpi eterofili in quanto mentre in alcuni studi è stato visto essere molto sensibile in questi pazienti (il 94% dei pazienti con infezione recente aveva anticorpi eterofili) (50), in altri studi un *pattern* con contemporanea positività per anti-EBNA-1 IgG, anti-VCA IgG, anti-VCA IgM e anticorpi eterofili è stato trovato in pochissimi casi (59).

L'uso della biologia molecolare sembra essere una questione abbastanza delicata. In caso di riattivazione c'è un aumento dei livelli di EBV-DNA nelle PBMC e nel siero/plasma. È stato riportato che la ricerca di EBV-DNA sia nei PBMC che nel siero/plasma è importante per l'immediata diagnosi di riattivazione.

Questo è vero soprattutto se è possibile seguire i pazienti nel tempo per rilevare le variazioni di

carica, mentre la rilevazione su singolo campione non deve necessariamente essere vista come un segno di riattivazione (75). Di conseguenza, dal momento che EBV-DNA è presente sia nei casi di riattivazione che nei casi di infezione primaria, il *test* eseguito su un solo campione può non essere in grado di distinguere tra queste due situazioni (13, 75) anche se una carica elevata riscontrata sia nel siero che nel sangue intero è suggestiva di infezione in atto in pazienti immunocompetenti e immunodepressi.

Un'infezione persistente o riattivata da EBV è caratterizzata da alti titoli di anti-EA (D) IgG soprattutto nei pazienti immunocompromessi (10, 40). Dopo riattivazione, infatti, questi anticorpi aumentano insieme ad anti-VCA IgG mentre anti-EBNA-1 IgG diminuiscono. Un aumento del titolo in anti-EA (D) IgG, quindi, è considerato un marcatore utile di riattivazione.

Poiché, però, gli anti-EA (D) IgG possono essere trovati anche nell'85% delle infezioni primarie e nel 20-30% delle infezioni pregresse, e la positività contemporanea di anti-VCA IgM, anti-VCA IgG, anti-EBNA-1 IgG e anti-EA (D) è stata vista sia nell'infezione recente che in corso di riattivazione (71), la ricerca degli anti-EA (D) IgG, come visto per la ricerca di EBV-DNA, sembra essere utile solo se si può eseguire un *follow-up*, mentre su singolo campione non sembra essere in grado di distinguere tra infezione recente e riattivazione. Altri anticorpi sono stati riscontrati in caso di riattivazione: è stato suggerito che gli anti-EBNA IgM possono essere potenzialmente utili nell'identificare una riattivazione da EBV (83), e la combinazione di anti-EBNA IgG negativi e anti-EBNA IgM positivi, oltre ad un'avidità alta per gli anti-VCA IgG entro tre mesi dall'infezione acuta, dovrebbero essere indice di una riattivazione piuttosto che un'infezione primaria da EBV (92).

Anche gli anti-VCA IgA sono stati suggeriti come marcatore di riattivazione. Questi anticorpi raggiungono il picco 3-4 settimane dopo l'infezione primaria e declinano lentamente, ma possono durare indefinitivamente. Sono presenti nell'infezione primaria nel 35-74.% dei casi, a seconda degli studi (35, 81, 84), ma sono stati visti anche nel 10% dei soggetti sani.

Alti livelli sono stati riscontrati anche in pazienti con immunodeficienze, parotiti ricorrenti, sclerosi multiple, carcinoma nasofaringeo, donne in gravidanza e soggetti anziani (2, 26, 40, 52, 63, 66) per cui generalmente la ricerca degli anti-VCA IgA è considerata utile solo nella diagnosi e gestione dei pazienti con carcinoma nasofaringeo (76, 99, 108).

Anche gli anti-EA-(R) IgG, anti-EA IgM, anti-VCA IgG 3, anti-EA IgA e il rapporto anti-EBNA-

1/anti-EBNA-2 (45, 67, 75, 83, 115) sono stati utilizzati in alcuni studi come marcatori di riattivazione, ma poiché molti di questi anticorpi (normalmente ricercati solo in laboratori di ricerca o di riferimento) sono presenti anche nell'infezione primaria e alcuni anche nell'infezione pregressa, la loro utilità su singolo campione nei pazienti con simultanea presenza di anti-EBNA-1 IgG, anti-VCA IgG e IgM deve essere ancora valutata.

Infine, l'utilizzo di valori di *cut-off* differenziati proposti dai più recenti CLIA nella determinazione in parallelo di anti-VCA IgG, anti-VCA IgM, anti-VCA IgG e anti-EBNA-1 IgG sembra essere un approccio promettente dal momento che dovrebbe permettere di distinguere le diverse fasi dell'infezione da EBV, soprattutto tra infezione primaria transitoria e pregressa o riattivazione (Tabella 5) (29, 73).

Profilo "anti-EBNA-1 IgG isolato"

Gli anti-VCA IgM generalmente appaiono al tempo stesso degli anti-VCA IgG, ma scompaiono completamente entro poche settimane (21, 27, 62, 81, 95, 96), mentre i pazienti rimangono anti-VCA IgG positivi per il resto della loro vita (95). Gli anti-EBNA-1 IgG di solito non possono essere rilevati durante le prime 3-4 settimane dopo l'insorgenza dei sintomi clinici (20, 95).

Di conseguenza, dal momento che gli anticorpi anti-VCA IgG persistono, ma gli anti-EBNA-1 IgG possono scomparire (specialmente nel caso di immunosoppressione) (8, 9, 110), un *pattern* di anti-VCA IgG isolato (senza anti-VCA IgM o anti-EBNA-1 IgG) è stato ampiamente documentato (vedi sopra), mentre la presenza di anti-EBNA-1 IgG senza anti-VCA IgG è considerato generalmente non plausibile (41).

Tuttavia, alcuni studi con *immunoblotting* hanno scoperto che il 2% di tutte le infezioni pregresse possono essere negative per anti-VCA IgG (anti-p23 o anti-p18) (8) e, sebbene raramente, questo *pattern* può essere trovato nella normale *routine* e può rappresentare l'1.7% di tutti i campioni con anti-EBNA-1 IgG-positivo (39).

Un profilo anti-EBNA-1 IgG isolato dà quindi luogo ad alcuni dubbi interpretativi. È possibile pensare ad un'aspecificità degli anti-EBNA-1 IgG, o alla mancata produzione di anticorpi anti-VCA IgG o alla loro perdita nel tempo. A livello clinico il problema è capire, quindi, se il paziente ha avuto un'infezione pregressa o è ancora suscettibile all'infezione.

Dato che il dubbio si pone tra aspecificità e un'infezione pregressa, è inutile la ricerca di anticorpi eterofili o dell'EBV-DNA.

La presenza di anti-EA(D) IgG potrebbe aiutare, in caso di positività, a indirizzare verso un'infe-

zione pregressa, poiché circa il 20-30% dei soggetti sani con infezione pregressa da EBV presentano anticorpi anti-EA (D) IgG (8, 65, 116). Nulla, però, si può dire in caso di negatività. Un *immunoblotting* per le IgG, invece, può risolvere il problema, in quanto può confermare la presenza reale di anti-EBNA-1 IgG. In uno studio è stato trovato che tali pazienti erano tutti anti-p72 (EBNA-1) positivi all'*immunoblotting* e tutti presentavano anche anti-p23 (VCA) non rilevati dai *test* di screening che utilizzavano per la ricerca degli anti-VCA IgG solo p18 come antigene (20). Quindi, sembra che non esista la presenza di anti-EBNA-1 IgG senza almeno un anti-VCA IgG (come anti-p23).

CONCLUSIONI

Un certo numero di *test* che sono stati sviluppati negli ultimi anni possono aiutare a chiarire i risultati dubbi nella diagnosi sierologica di infezione da EBV. Oggi è generalmente possibile arrivare ad una definizione dell'infezione, senza dover attendere un secondo campione prelevato a distanza di tempo.

Quali altri *test* devono essere utilizzati dopo lo *screening* dipende da vari fattori in aggiunta alla

loro appropriatezza scientifica e tecnica, comprese questioni organizzative ed economiche come le differenze di costi e i rimborsi previsti dal Servizio Sanitario Nazionale, lo spazio e la disponibilità di personale addestrato e la possibilità di avere una formazione adeguata.

Inoltre, il numero di esami di *routine* (e quindi il numero di campioni con risultati inconcludenti) influisce sulla decisione di effettuare ulteriori *test* più o meno costosi in laboratorio o di inviare il campione (o il paziente) ad un laboratorio di riferimento.

Infine, anche la tipologia dei pazienti può essere decisiva: se il laboratorio non ha solo a che fare con campioni prelevati da pazienti immunocompetenti, ma anche con campioni provenienti da pazienti immunodepressi e/o con altre patologie EBV correlate, la scelta di ulteriori metodi dovrebbe privilegiare quelli adatti per tutti i tipi di pazienti.

In conclusione, notevoli progressi sono stati compiuti nella diagnosi sierologica di infezione da EBV e, utilizzando opportuni algoritmi e opportune metodologie, si riesce ad arrivare alla risoluzione di tutti i problemi che possono emergere nella diagnostica di laboratorio.

Tabella 1. Interpretazione dei profili sierologici dell'EBV a fini diagnostici nel paziente immunocompetente

| Anti-VCA IgM | Anticorpi anti-EBV | | Interpretazione |
|--------------|--------------------|-----------------|-------------------------------------|
| | Anti-VCA IgG | Anti-EBNA-1 IgG | |
| Negativo | Negativo | Negativo | Assenza di infezione |
| Positivo | Negativo | Negativo | Infezione acuta o aspecificità* |
| Positivo | Positivo | Negativo | Infezione acuta |
| Negativo | Positivo | Positivo | Infezione pregressa |
| Negativo | Positivo | Negativo | Infezione acuta o pregressa* |
| Positivo | Positivo | Positivo | Infezione recente o riattivazione* |
| Negativo | Negativo | Positivo | Infezione pregressa o aspecificità* |

* Ulteriori *test* sono necessari per dirimere i dubbi

Tabella 2. Interpretazione dell'avidità delle IgG con test immunoblotting

| Bande IgG | avidità IgG | Interpretazione |
|-----------------|--|-----------------------------|
| negativo | Non osservata | Assenza di infezione |
| Positivo | Bassa-alta avidità per anti-BZLF1 e/o anti-p138 e/o anti-p54 | Infezione acuta |
| Positivo | Anti-p23, anti-BZLF1 (IEA), anti-p138, anti-p54 | Infezione acuta |
| Positivo | Anti-p23, anti-BZLF1, anti-p138, anti-p54 | Infezione recente |
| Positivo | Anti-p18, anti-p23, anti-BZLF1, anti-p138, anti-p54 | Infezione recente |
| Positive | Anti-EBNA-1, anti-p18, anti-p23, anti-BZLF1, anti-p138, anti-p54 | Infezione pregressa |

Tabella 3. Test aggiuntivi in caso di profilo anti-VCA IgG isolato

| Test | Vantaggi | Svantaggi |
|--|---|--|
| Immunoblotting per anti-EBV IgG | Utile nel distinguere tra infezione acuta e pregressa | Produzione individuale degli anticorpi; costoso |
| Avidità delle IgG | Utile nel distinguere tra infezione acuta e pregressa | Maturazione individuale degli anticorpi; Non utile nei neonati |
| Biologia molecolare (ricerca EBV- DNA) | Utile nel distinguere tra infezione acuta e pregressa. | Azione delle nucleasi; costoso; problemi organizzativi |
| Anticorpi eterofili | Utile nel distinguere tra infezione acuta e pregressa se positive; poco costoso e semplice | Bassa sensibilità (specialmente nei bambini) |
| Anti-EA(D) IgG | Di qualche utilità nel distinguere tra infezione acuta e pregressa; costi simili allo screening | Non utile in almeno il 10% dei casi. |

Tabella 4. Test aggiuntivi in caso di profilo con presenza contemporanea di anti-EBNA-I IgG, anti-VCA IgG e anti-VCA IgM.

| Test | Vantaggi | Svantaggi |
|--|---|--|
| Immunoblotting per anti-EBV IgM | Utile solo nel verificare la specificità degli anti-EBV IgM | Non utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione; costoso |
| Anti-HCMV IgM Parvovirus IgM | Utile solo nel verificare la specificità degli anti-EBV IgM | Non utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione |
| Immunoblotting per anti-EBV IgG | Utile nel verificare la specificità degli anti-EBNA-I IgG. | Non utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione; costoso |
| Avidità delle IgG | Utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione | Maturazione individuale degli anticorpi |
| Biologia molecolare (ricerca EBV-DNA) | Utile per identificare le riattivazioni se possibile il <i>follow-up</i> del paziente | Poco utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione in un singolo campione; costoso; problemi organizzativi |
| Anticorpi eterofili | Potenzialmente utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione se positivo; poco costoso e semplice | Bassa sensibilità (specialmente nei bambini) |
| Anti-EA(D) IgG | Utile per identificare le riattivazioni se possibile il <i>follow-up</i> del paziente | Non utile nel distinguere tra infezione recente e riattivazione in un singolo campione. |
| CLIA per anticorpi anti-EBV antibodies con differenti <i>cut-off</i> | Utile nel distinguere tra infezione recente e pregressa; può essere usata per lo screening | Ulteriori studi sono necessari per valutarne l'utilità |

Tabella 5. Interpretazione dei risultati della ricerca degli anticorpi anti-EBV con metodica CLIA (DiaSorin, Saluggia, Italia).

| Anti-EBV IgM | Risultati (U/mL) | | Interpretazione |
|--------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|
| | Anti-VCA IgG | Anti-EBNA-I IgG | |
| <20 | <20 | <20 | Assenza di infezione |
| ≥20 | <20 | <20 | Infezione primaria (precoce) |
| ≥20 | ≥20 | <20 | Infezione primaria (acuta) |
| ≥40 | ≥20 | ≥20 | Infezione primaria (recente) |
| <40 | ≥20 | ≥20 | Infezione pregressa o riattivazione |
| <20 | ≥20 | ≥5 | Infezione pregressa o riattivazione |
| <20 | >20 | <5 | Dubbio |

BIBLIOGRAFIA

- Aalto SM, Linnavuori K, Peltola H, et al. Immunoreactivation of Epstein-Barr virus due to cytomegalovirus primary infection. *J Med Virol* 1998; 56(3): 186-91.
- Akaboshi I, Jamamoto J, Katsuki T, Matsuda I. Unique pattern of Epstein barr virus specific antibodies The significance of serum IgM IgA and IgG antibodies specific for Epstein-Barr virus as determined by immunoperoxidase assay in the rapid diagnosis of infectious mononucleosis in recurrent parotitis. *Lancet* 1983; 2(8358): 1049-51.
- Ambinder RF, Lin L. Mononucleosis in the laboratory. *J Infect Dis* 2005; 192(9): 1503-4.
- Andersson A, Vetter V, Kreutzer L, Bauer G. Avidities

- of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. *J Med Virol* 1994; 43(3): 238-44.
5. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190(4): 567-76.
 6. Balfour HH Jr, Holman CJ, Hokanson KM, et al. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005; 192(9): 1505-12.
 7. Bauer CC, Aberle SW, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stöckl E. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2005; 75(1): 54-8.
 8. Bauer G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin Lab* 2001; 47(5-6): 223-30.
 9. Bauer G. The rational basis for efficient Epstein-Barr virus (EBV) serology. *Clin Lab* 1995; 41: 623-34.
 10. Bennett NJ, Domachowske J. Mononucleosis and Epstein-Barr virus infection. *emedicine* from WebMD (updated October 12 2010) <http://emedicine.medscape.com/article/963894-overview>
 11. Berger C, Day P, Meier G, Zingg W, Bossart W, Nadal D. Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 2001; 64(4): 505-12.
 12. Bruu AL, Hjetland R, Holter E, et al. Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(3): 451-6.
 13. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4152-4.
 14. Coyle PV, Wyatt D, Connolly JH, Lynch GA. Antibodies to Epstein-Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma in Northern Ireland. *Ir J Med Sci* 1987; 156(6): 182-4.
 15. de Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31(6): 1669-71.
 16. de Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, García-Bermejo I. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(3): 444-8.
 17. De Paoli P, Pratesi C, Bortolin MT. The Epstein Barr virus DNA levels as a tumor marker in EBV-associated cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(11): 809-15.
 18. De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, Mirri P, Viganò EF, Clerici P. Seroepidemiology of EBV and interpretation of the "isolated VCA IgG" pattern. *J Med Virol* 2009 ; 81(2): 325-31.
 19. De Paschale M, Cagnin D, Cerulli T, et al. Search for Anti-EA(D) Antibodies in Subjects with an "Isolated VCA IgG" Pattern. *Int J Microbiol* 2010; 2010: 695104. Epub 2010 Jun 20.
 20. De Paschale M, Cagnin D, Manco MT, Clerici P. Significance of the "isolated EBNA-1 IgG" pattern in past EBV infection. *Microbiol Med* 2009; 24: 50-2.
 21. Evans AS, Niederman JC, Cenabre LC, West B, Richards VA. A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr virus-specific IgM antibody tests in clinical and subclinical infectious mononucleosis: Specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibody. *J Infect Dis* 1975; 132(5): 546-54.
 22. Evans AS, Niederman JC. Epstein-Barr virus. In: *Viral infection of humans, epidemiology and control*, Evans AS Ed. Plenum Medical Book Company, New York 1982; 253-81.
 23. Fan H, Kim SC, Chima CO, et al. Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med Virol* 2005; 75(1): 59-69.
 24. Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, et al. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005; 191(6): 985-9.
 25. Fikar CR, McKee C. False positivity of IGM antibody to Epstein-Barr viral capsid antigen during acute hepatitis A infection. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13(5): 413-4.
 26. Fleisher G, Bolognese R. Persisten Epstein-Barr virus infection and pregnancy. *J Infect. Dis* 1983; 147(6): 982-6.
 27. Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, Biggar RJ. Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *J Infect Dis* 1979; 139(5): 553-8.
 28. Gan YJ, Sullivan JL, Sixbey JW. Detection of cell-free Epstein-Barr virus DNA in serum during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1994; 170(2): 436-9.
 29. Garetto F. Determinazioni anticorpali nella diagnosi di patologie infettive. *LiganAssay* 2002; 10: 64-5.
 30. Gärtner BC, Fischinger JM, Roemer K, Mak M, Fleurent B, Mueller-Lantzsch N. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr Virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J Virol Methods* 2001; 93(1-2): 89-96.
 31. Gärtner BC, Hess RD, Bandt D, et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(1): 78-82.
 32. Gray JJ. Avidity of EBV VCA-specific IgG antibodies: distinction between recent primary infection, past infection and reactivation. *J Virol Methods* 1995; 52(1-2): 95-104.
 33. Gulley ML, Fan H, Elmore SH. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr virus quantification reagents in a clinical laboratory setting. *J Mol Diagn* 2006; 8(5): 589-97.
 34. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 279-92.
 35. Hadar T, Margalith M, Sagiv E, Sarov B, Sarov I. The significance of serum IgM IgA and IgG antibodies specific for Epstein-Barr virus as determined by immunoperoxidase assay in the rapid diagnosis of infectious mononucleosis. *Isr J Med Sci* 1995; 31(5): 280-3.
 36. Hara S, Kimura H, Hoshino Y, et al. Detection of herpesvirus DNA in the serum of immunocompetent children. *Microbiol Immunol* 2002; 46(3): 177-80.
 37. Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2008; 46(1): 157-63.
 38. Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 1966; 91(3): 1248-56.
 39. Henle W, Henle G, Andersson J, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear

- antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(2): 570-4.
40. Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus-specific serology in immunologically compromised individuals. *Cancer Res* 1981; 41(11): 4222-5.
 41. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(8): 3381-7.
 42. Ho DW, Field PR, Cunningham AL. Rapid diagnosis of acute Epstein-Barr virus infection by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific immunoglobulin M (IgM) antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. *J Clin Microbiol* 1989; 27(5): 952-8.
 43. Holmes RD, Sokol RJ. Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2002; 6(6): 456-64.
 44. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Schapiro R, Borken S, Bundtzen R. Infectious mononucleosis in patients aged 40 to 72 years: report of 27 cases, including 3 without heterophil-antibody responses. *Medicine (Baltimore)* 1983; 62(4): 256-62.
 45. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Schmitz H. Clinical evaluation of patients with infectious mononucleosis and development of antibodies to the R component of the Epstein-Barr virus-induced early antigen complex. *Am J Med* 1975; 58(3): 330-8.
 46. Ikuta K, Saiga K, Deguchi M, Sairenji T. Epstein-Barr virus DNA is detected in peripheral blood mononuclear cells of EBV-seronegative infants with infectious mononucleosis-like symptoms. *Virus Genes* 2003; 26(2): 165-73.
 47. Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J Clin Microbiol* 1984; 20(3): 525-9.
 48. Irving WL, Ratnamohan VM, Hueston LC, Chapman JR, Cunningham AL. Dual antibody rises to cytomegalovirus and human herpesvirus type 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity to both viruses. *J Infect Dis* 1990; 161(5): 910-6.
 49. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61(4): 1659-65.
 50. Jensen IP, Vestergaard BF. Assessment of the specificity of a commercial human parvovirus B19 IgM assay. *Clin Diagn Virol* 1997; 7(3): 133-7.
 51. Jenson HB. Virologic Diagnosis, Viral Monitoring, and Treatment of Epstein-Barr Virus Infectious Mononucleosis. *Curr Infect Dis Rep* 2004; 6(3): 200-7.
 52. Joncas J, Lapointe N, Gervais F, Leyritz M, Wills A. Unusual prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus early antigen in ataxia telangiectasia. *Lancet*. 1977; 1(8022): 1160.
 53. Kampmann M, Henninger K, Bauer G. Determination of antibodies direct specifically against Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) by anticomplementary immunofluorescence (ACIF). *Med Microbiol Lett* 1993; 2: 1-8.
 54. Kimura H, Hoshino Y, Hara S, et al. Viral load in Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome. *Microbiol Immunol* 2002; 46(8): 579-82.
 55. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 2008; 18(5): 305-19.
 56. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(1): 132-6.
 57. Kimura H, Nishikawa K, Hoshino Y, Sofue A, Nishiyama Y, Morishima T. Monitoring of cell-free viral DNA in primary Epstein-Barr virus infection. *Med Microbiol Immunol* 2000; 188(4): 197-202.
 58. Kimura H. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection: is this an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency? *Rev Med Virol* 2006; 16(4): 251-61.
 59. Klutts JS, Ford BA, Perez NR, Gronowski AM. Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3204-10.
 60. Klutts JS, Wu AH, Smith A, Yen-Lieberman B, Gronowski AM. Diagnostic performance of a new automated heterophile antibody test in adults and children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61(3): 351-3.
 61. Kocks C, Rajewsky K. Stepwise intracлонаl maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(21): 8206-10.
 62. Lamy ME, Favart AM, Cornu C, Mendez M, Segas M, Burtonboy G. Study of Epstein Barr virus (EBV) antibodies: IgG and IgM anti-VCA, IgG anti-EA and Ig anti-EBNA obtained with an original microtiter technique: -serological criterions of primary and recurrent EBV infections and follow-up of infectious mononucleosis-seroepidemiology of EBV in Belgium based on 5178 sera from patients. *Acta Clin Belg* 1982; 37(5): 281-98.
 63. Larson PD, Bloomer LC, Bray PF. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 1985; 35(3): 435-8.
 64. Lennette ET, Henle W. Epstein-Barr virus infections: clinical and serologic features. *Lab Manag* 1987; 25: 23-6.
 65. Lennette ET. Epstein-Barr virus (EBV). In: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*, Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET Eds. American Public Health Association, Washington 1995; 299-312.
 66. Li S, Deng Y, Li X, Chen QP, Liao XC, Qin X. Diagnostic value of Epstein-Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123(9): 1201-5.
 67. Linde A, Andersson J, Lundgren G, Wahren B. Subclass reactivity to Epstein-Barr virus capsid antigen in primary and reactivated EBV infections. *J Med Virol* 1987; 21(2): 109-21.
 68. Linde A, Kallin B, Dillner J, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with two synthetic peptides of Epstein-Barr virus for diagnosis of infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1990; 161(5): 903-9.
 69. Lo YM, Chan LY, Chan AT, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59(21): 5452-5.
 70. Lo YM, Chan LY, Lo KW, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59(6): 1188-91.
 71. Luderer R, Kok M, Niesters HG, Schuurman R, de Weerd O, Thijsen SF. Real-time Epstein-Barr virus

- PCR for the diagnosis of primary EBV infections and EBV reactivation. *Mol Diagn* 2005; 9(4): 195-200
72. Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(3): 131-40.
 73. Marchetti D, Antonelli S, Deleonardi G, *et al.* (2008). Infezioni da virus Epstein-Barr e pannelli anticorpali efficaci per una corretta diagnosi dell'infezione. XXXVII Congresso Nazionale AMCLI, Stresa (Italy), 5-8 Ottobre 2008.
 74. Matheson BA, Chisholm SM, Ho-Yen DO. Assessment of rapid ELISA test for detection of Epstein-Barr virus infection. *J Clin Pathol* 1990; 43(8): 691-3.
 75. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, *et al.* Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5419-28.
 76. Mazerun MC. Value of anti-Epstein-Barr antibody detection in the diagnosis and management of undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Bull Cancer Radiother* 1996; 83(1): 3-7.
 77. Miller G, Grogan E, Rowe D, *et al.* Selective lack of antibody to a component of EB nuclear antigen in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 1987; 156(1): 26-35.
 78. Nalesnik MA. Epstein-Barr Virus. In: *Laboratory diagnosis of viral infections*, Lennette EH, Smith TF Eds. Marcel Dekker Inc, New York 1999; 385-419.
 79. National Protection Agency. Epstein-Barr virus serology – minimum testing algorithm. National Standard Method VSOP 26 Issue 3, 2008. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sosps.asp
 80. Naveau S, Delfraissy JF, Poitrine A, Poynard T, Chaput JC. Simultaneous detection of IgM antibodies against the hepatitis A virus and the viral capsid antigen of Epstein-Barr virus in acute hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9(2): 109-12.
 81. Nikoskelainen J, Neel EU, Stevens DA. Epstein-Barr virus-specific serum immunoglobulin A as an acute-phase antibody in infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1979; 10(1): 75-9.
 82. Nystad TW, Myrmet H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 2007; 38(4): 292-7.
 83. Obel N, Høier-Madsen M, Kangro H. Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. *APMIS* 1996; 104(6): 424-8.
 84. Oberender H, Straube E, Kunkel M, Gärtner L, Morfiadakis I. Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin A in patients with infectious mononucleosis, an age-dependent factor. *Eur J Clin Microbiol* 1986; 5(2): 173-4.
 85. Paul JR, Bunnell WW. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am J Med Sci* 1974; 267(3): 178-88.
 86. Pitetti RD, Laus S, Wadowsky RM. Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22(8): 736-9.
 87. Preiksaitis JK, Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Caliendo AM, Miller GG; American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. Interlaboratory comparison of Epstein-Barr virus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9(2): 269-79.
 88. *RecomLine EBV IgG Avidity. Instruction for use.* Mikrogen, Germany, June 2008
 89. Reedman BM, Klein G. Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 1973; 11(3): 499-520.
 90. Rhodes G, Smith RS, Rubin RE, Vaughan J, Horwitz CA. Identical IgM antibodies recognizing a glycine-alanine epitope are induced during acute infection with Epstein-Barr virus and cytomegalovirus. *J Clin Lab Anal* 1990; 4(6): 456-64.
 91. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: *Fields virology*, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B Eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 2575-627
 92. Robertson P, Beynon S, Whybin R, *et al.* Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection. *J Med Virol* 2003; 70(4): 617-23.
 93. Rosen A, Gergely P, Jondal M, Klein G, Britton S. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature* 1977; 267(5606): 52-4.
 94. Ryan JL, Fan H, Swinnen LJ, *et al.* Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in plasma is not encapsidated in patients with EBV-related malignancies. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13(2): 61-8.
 95. Schillinger M, Kampmann M, Henninger K, Murray G, Hanselmann I, Bauer G. Variability of humoral immune response to acute Epstein-Barr virus (EBV) infection: evaluation of the significance of serological markers. *Med Microbiol Lett* 1993; 2: 296-303.
 96. Schmitz H, Volz D, Krainick-Riechert C, Scherer M. Acute Epstein-Barr virus infections in children. *Med Microbiol Immunol* 1972; 158(1): 58-63.
 97. Schubert J, Zens W, Weissbrich B. Comparative evaluation of the use of immunoblots and of IgG avidity assays as confirmatory tests for the diagnosis of acute EBV infections. 1998; 11(3): 161-72.
 98. Sener AG, Afsar I, Pinar E. Evaluation of Epstein-Barr virus antibodies, anti-VCA avidity by immunofluorescence and immunoblot assays for assessment of Epstein-Barr virus immunologic state. *J Virol Methods* 2009; 159(2): 300-2.
 99. Shimakage M, Dezawa T, Chatani M. Proper use of serum antibody titres against Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma: IgA/virus capsid antigen for diagnosis and EBV-related nuclear antigen-2 for follow-up. *Acta Otolaryngol* 2000; 120(1): 100-4.
 100. Steven NM. Infectious mononucleosis. *EBV Reports* 1996; 3: 91-5.
 101. Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuujlen SA, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Middeldorp JM. Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* 2002; 43(4): 831-40.
 102. Stevens SJ, Smits PH, Verkuujlen SA, *et al.* Aberrant Epstein-Barr virus persistence in HIV carriers is characterized by anti-Epstein-Barr virus IgA and high cellular viral loads with restricted transcription. *AIDS* 2007; 21(16): 2141-9.
 103. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, *et al.* Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009; 43(10): 757-70.
 104. Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985; 75(6):

- 1011-9.
105. Sumaya CV. Endogenous reactivation of Epstein-Barr virus infections. *J Infect Dis* 1977; 135(3): 374-9.
 106. Svahn A, Magnusson M, Jägdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, Linde A. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35(11): 2728-32.
 107. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 75-82.
 108. Tsang RK, Vlantis AC, Ho RW, Tam JS, To KF, van Hasselt CA. Sensitivity and specificity of Epstein-Barr virus IGA titer in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: a three-year institutional review. *Head Neck* 2004 Jul; 26(7): 598-602.
 109. Van Essen GG, Lieverse AG, Sprenger HG, Schirm J, Weits J. False positive Paul-Bunnell tests in HIV seroconversion. *Lancet* 1988; 2(8613): 747-8.
 110. Vetter V, Kreuzer L, Bauer G. Differentiation of primary from secondary anti-EBNA-1-negative cases by determination of avidity of VCA-IgG. *Clin Diagn Virol* 1994; 2 (1): 29-39.
 111. Weber B, Brunner M, Preiser W, Doerr HW. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. *J Virol Methods* 1996; 57(1): 87-93.
 112. Weissbrich B. The use of semi-automated EBV IgG avidity determination for the diagnosis of infectious mononucleosis. *J Med Virol* 1998; 54(2): 145-53.
 113. Werblin TP, Kim YT, Quagliata F, Siskind GW. Studies on the control of antibody synthesis. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. *Immunology* 1973; 24(3): 477-92.
 114. Wiedbrauk DL, Bassin S. Evaluation of five enzyme immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus viral capsid antigens. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5): 1339-41.
 115. Winkelspecht B, Grässer F, Pees HW, Mueller-Lantzsch N. Anti-EBNA1/anti-EBNA2 ratio decreases significantly in patients with progression of HIV infection. *Arch Virol* 1996; 141(5): 857-64.
 116. Wohlrabe P, Färber I, Wutzler P, Uhlig R. Antibodies to Epstein-Barr virus-induced early antigens in blood donors. *Acta Virol* 1989; 33(4): 344-8.
 117. Wolter T, Gassmann C, Vetter V, Bauer G. Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections. *Clin Lab* 1997; 43: 125-35.
 118. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, et al. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33(7): 1765-8.