

LENFOMALI HASTALARIN DOKULARINDA EPSTEIN-BARR VİRUS DNA VE RNA'SININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS DNA AND RNA IN
TISSUES OF PATIENTS WITH LYMPHOMA

Ayşın ZEYTİNOĞLU**, **Mine HEKİMGİL*****, **Selda ERENŞOY****
Şöhret AYDEMİR**, **Sahir BERBER****, **Seçkin ÇAĞIRGAN******
Salıha SOYDAN***, **Altınay BİLGİÇ****

ÖZET: Epstein-Barr virus (EBV) ile nazofaringeal karsinoma, Burkitt lenfoma (BL) ve immün yetmezlikli hastalarda görülen lenfomaların ilişkisi gösterilmiştir. Hodgkin lenfoma (HL) ve diğer bazı Hodgkin dışı lenfoma (non-Hodgkin lenfoma; NHL) tiplerinde de benzer ilişkiler tanımlanmıştır. Bu çalışmada, lenfoma tanısı alan erişkin hastaların dokularında EBV nükleik asitlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Hastanemiz Hematoloji bölümünde izlenen 29 lenfomalı (8 HL ve 21 NHL) olgunun formalinle tesbitlenmiş parafine gömülü doku örneklerinde (19'u lenf nodülü, diğerleri mide, orbita, deri, tükrük bezi, testis, ince barsak, dil kökü, kemik iliği, jinjiva dokuları) in situ hibridizasyon (ISH) ile EBV tarafından kodlanan RNA (EBER; EBV encoded RNA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile EBV DNA'sı araştırılmıştır. HL'lı 8 olgunun 4'ünün (%50) ve NHL'lı 21 olgunun 5'inin (%23.8) doku örneğinde EBER, HL olgularının 3'ünde (%37.5) ve NHL olgularının 10'unda (%47.6) ise DNA pozitifliği saptanmıştır. Toplam olarak değerlendirildiğinde, HL olgularının 5'inde (%62.5) ve NHL olgularının 12'sinde (%57.1) EBER ve/veya DNA varlığı gösterilmiştir. HL ve NHL grupları arasında EBER ve DNA pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Sonuç olarak, HL ve NHL etiolojisinde olası EBV ilişkisi çalışmamızda da desteklenmiştir.

Anahtar sözcükler: Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, Epstein Barr virus.

ABSTRACT: Relation between Epstein-Barr virus (EBV) and nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, and lymphomas in immunosuppressed patients have been shown previously in different studies. The same relationship was also shown in Hodgkin lymphoma (HL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL) by some

* Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu (proje no: 00 TIP 015) tarafından desteklenmiş ve I. Ulusal Viroloji Kongresi'nde (21-25 Eylül 2003, Kuşadası) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

** Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

*** Patoloji Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

**** İç hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

researchers. The aim of this study was to demonstrate EBV nucleic acids in tissue sections of adult patients with lymphoma. The presence of EBV encoded RNA (EBER) were investigated with in situ hybridization and EBV-DNA with PCR method in 29 formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (19 lymph nodes, the others being gastric, orbital, skin, salivary gland, testicle, small intestinal, tongue root, bone marrow and gingival tissues) of 8 patients with HL and 21 patients with NHL who were followed-up in Haematology Clinics of our university hospital. EBER and EBV-DNA positivity rates were found as follows respectively; 50% (n: 4) and 37.5% (n: 3) of 8 HL patients, and 23.8% (n: 5) and 47.6% (n: 10) of 21 NHL patients. In total evaluation EBER and/or EBV-DNA were positive in 5 of 8 (62.5%) HL, and 12 of 21 (57.1%) NHL tissue sections. There was no significant difference in EBER and EBV-DNA positivity between HL and NHL groups. As a result, our study emphasize a possible EBV related aetiology in HL and NHL.

Key words: Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, Epstein Barr virus.

G İ R İ Ő

Epstein-Barr virus (EBV), B lenfosit tropizmi olan ve toplumda sık karşılaşılan bir insan herpes virus ailesi üyesidir. İnsan herpes virus 4 olarak da adlandırılır. İnsandan insana sıklıkla orofarinks salgıları ile yakın temas, nadiren de damlacık enfeksiyonu şeklinde bulaşır¹. Değişik ülkelerde erişkin yaş grubunda seropozitiflik oranları %80-100 arasında değişmekte olup, bu oran toplumumuz için %80-86 oranlarındadır¹⁻³.

Enfeksiyöz mononükleozis (İM) hastalığının etiyolojik etkeni olan EBV ile nazofarengeal karsinoma (NC), Burkitt lenfoma (BL) ve immün yetmezlikli hastalarda görülen lenfomalar arasında ilişki saptanmıştır^{4,5}. Fakültemizde Berber'in⁶ 85 lenfomalı olguda yaptığı bir çalışmada, EBV kapsid antijenine (VCA-IgG) ve erken antijenine (EA-IgG) karşı antikor pozitifliği sırasıyla %98.8 ve %25.8 olarak bulunmuştur. Bu grupta anti-EA antikorları, Hodgkin lenfoma (HL) ve Hodgkin dışı lenfoma (non-Hodgkin lenfoma; NHL) olgularında sırasıyla %44.4 ve %20.8 oranında pozitifdir⁶. BL ve NC gibi EBV ile ilişkili malignitelere, EBV ile karşılaşmayı gösteren VCA-IgG ve anti-EBNA göstergelerinin yanı sıra virusun reaktivasyonunu gösteren anti-EA da pozitifdir⁷. Anti-EA, serolojik reaktivasyon göstergesi olarak uzun yıllar tanıda kullanılmış ancak moleküler yöntemlerin yaygınlaşması ile birlikte bu hasta gruplarında DNA veya RNA testleri tanıda daha çok önem kazanmıştır⁸.

Transplantasyon sonrası lenfoproliferatif hastalık (PTLD) gibi durumlarda, seroloji yetersiz olduğu için etkenin antijenlerinin veya nükleik asitlerinin dokuda gösterilmesi daha anlamlıdır. Hızlı tanı konması gereken bu hasta grubunda özellikle dokuda EBV tarafından kodlanan RNA'nın (EBER) gösterilmesi tedaviyi de yönlendirmektedir. Bu amaçla kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi, oldukça duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır⁹.

Bu çalışmada, farklı tip lenfomalı EBV seropozitif hastaların doku örneklerinde EBER ve EBV-DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler: Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji servisi ve polikliniğinde izlenen 18-74 yaşları arasındaki (yaş ortalaması: 47 yıl) 29 lenfomalı (8 Hodgkin ve 21 Hodgkin dışı) olgu dahil edildi (Tablo I).

Olguların tümünde EBV VCA-IgG pozitif, 11'inde ise EA-IgG pozitif idi. EBNA IgG antikorlarına bakılmadı.

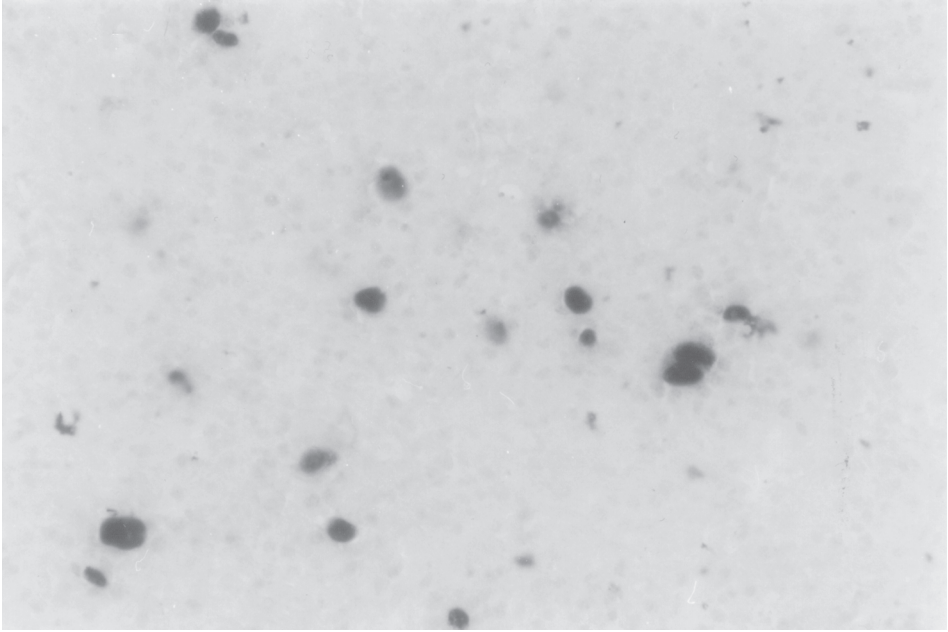
EBER ve EBV-DNA'nın araştırılması için olguların formalinle tesbit edilmiş parafine gömülü doku örnekleri kullanıldı. Dokuların 19'u lenf nodülü, 10'u diğer dokuları (mide, orbita, deri, tükrük bezi, testis, ince barsak, dil kökü, kemik iliği, jinja) içermekte idi.

Tablo I: Lenfomalı Olguların Histolojik Tanıları

Hasta Grubu (n)	Lenfoma Tipi (n)
Hodgkin lenfoma (8)	Mikst selüler tip (4) Nodüler sklerozan tip (3) Lenfositten fakir tip (1)
Hodgkin dışı lenfoma* (21)	Foliküler lenfoma (3) Küçük lenfositik lenfoma-B hücreli (1) Difüz büyük B hücre lenfoması (9) Mantle cell lenfoma (1) Anaplastik büyük hücreli lenfoma-T hücreli (2) Lenfoblastik lenfoma-B hücreli (1) Lenfoblastik lenfoma-T hücreli (1) Burkitt lenfoma (2) Burkitt benzeri lenfoma (1)

* Olgularının 18'i B hücre ve üçü T hücre kökenlidir.

EBER In Situ Hibridizasyon Yöntemi: Örnekler 5 µm'lik kesitler halinde lama alındı, bir gece 56°C'da tutularak ksilen ile deparafinize edildi. Örneklerin proteoliz işlemi Proteinaz K ile yapıldı. Daha sonra etanol ile dehidrate edilen kesitlerin üzerine iki damla floresanla işaretli konjuge peptid nükleik asit (PNA) probu eklendi. Saptama için ticari bir kit (PNA ISH Detection Kit, DAKO A/S, Danimarka) kullanıldı. EBER aranan test örneklerine EBER PNA probu (probe/FITC, Dako A/S, Danimarka), pozitif kontrol olarak saptama kitinin içindeki pozitif kontrol -hibridizasyon solüsyonundaki gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaza yönelik floresan işaretli prob- ve negatif kontrol probu (PNA ISH Detection Kit, DAKO A/S, Danimarka) kullanıldı. 55°C'de 90 dakika inkübasyon ve yıkamadan sonra eklenen alkalin fosfat konjuge tavşan F(ab') anti-FITC ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Yıkama işlemlerinden sonra eklenen substrat (BCIP/NBT/levamisole-endojen alkalin fosfat inhibitörü) ile 60 dakika inkübe edildi (PNA ISH Detection Kit, DAKO A/S, Danimarka). Kaplama sıvısı ve lamelle kapatılan örnekler x400 büyütme ile ışık mikroskopunda incelendi. Hücre içindeki lacivert/siyah boyanma pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 1).



Şekil 1: Lenf nodülü dokusunda EBER pozitifliği (x400).

Tüm basamaklarda eldiven kullanıldı. Cam malzemeler ve distile su RNaz'lardan arındırıldı.

EBV-DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): Formalinle fikse parafine gömülü bloklardan 10 µm'lik kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon işleminden sonra alkol ile yıkanıp rehidrate örneklerden proteinaz K ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. EBV DNA genomunda 11 kez tekrarlanan 296 baz çiftlik BamHI-W bölgesini hedefleyen primerler ve biotin işaretli prob kullanıldı. EBV pozitif primeri 5'- TCG CGT TGC TAG GCC ACC TT-3', negatif primeri 5'-CTT GGA TGG CGG AGT CAG CG-3' ve probu 5'-/5 Bio/ TTT ACG TAA GCC AGA CAG CAG CCA A-3' kullanıldı¹⁰⁻¹².

Digoksinin işaretli dUTP ile ampliconlar işaretlendi. Örnekler otomatik ısı döngü sisteminde (Thermal cycler-9600, Perkin Elmer, ABD) şu protokol ile çoğaltıldı: a) 94°C'de 5 dakika, b) 35 döngü sırasıyla 94°C'de 60 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 60 saniye, c) 72°C'de 10 dakika.

Digoksinin işaretli ampliconlar PCR ELISA-DIG Detection kiti (Roche Diagnostics, Branchburg, ABD) ile saptandı. Testte biotin işaretli oligonükleotid probu digoksinin işaretli ampliconlarla birleşmektedir. Bu prob-amplicon hibridi streptavidin kaplı mikroçukurlarda fiks edilmiştir. Bu komplekse peroksidaz ile konjuge anti-digoksinin antikorları bağlanır ve ABTS kolorimetrik substrat ile görüntülenir.

Amplicon taşınmasının engellenmesi için önerilen PCR çalışma kurallarına uyuldu¹³. EBV-DNA PCR testi; kantitasyonu bilinen bir pozitif kontrolle (Erasmus Tıp Merkezi, Viroloji Bölümü'nden, Prof.Dr.HGM Niesters'den sağlandı) çalışıldığında 5 kopya/ml'ye kadar EBV DNA'sı saptayabilmekte idi.

İstatistiksel değerlendirmeler için Ki kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan lenfomalı 29 hastanın 9'unda (%31.0) EBER, 13'ünde (%44.8) EBV-DNA pozitifliği saptanmıştır. Örneklerden 12'sinde (%41.4) testlerden biri ve 5'inde (%17.24) her ikisi de pozitifdir (Tablo II ve III).

Tablo II: Olguların Serolojik ve Moleküler Test Sonuçları

Olgu No.	Tanı (Hücre Tipi)	Anti-EA	VCA IgM*	EBER	EBV-DNA
1.	NHL** (B)	+	+	-	+
2.	NHL(B)	+	-	-	-
3.	NHL(B)	+	-	+	-
4.	NHL(B)	+	+	-	-
5.	NHL(B)	+	-	+	+
6.	NHL(B)	+	-	-	+
7.	NHL(B)	-	-	-	+
8.	NHL(B)	-	-	-	+
9.	NHL(B)	-	-	-	+
10.	NHL(B)	-	-	-	-
11.	NHL(B)	-	-	+	+
12.	NHL(B)	-	-	-	+
13.	NHL(B)	-	-	-	-
14.	NHL(B)	-	-	-	-
15.	NHL(B)	-	-	-	-
16.	NHL(B)	-	-	+	+
17.	NHL(B)	-	-	-	-
18.	NHL(B)	-	-	-	-
19.	NHL(T)	+	-	-	-
20.	NHL(T)	-	-	-	+
21.	NHL(T)	-	-	+	-
22.	HL**	+	-	+	-
23.	HL	+	-	+	-
24.	HL	+	-	-	+
25.	HL	+	-	-	-
26.	HL	-	-	+	+
27.	HL	-	-	-	-
28.	HL	-	-	-	-
29.	HL	-	-	+	+

* Tüm olgularda VCA-IgG pozitifdir.

** NHL: Hodgkin dışı lenfoma, HL: Hodgkin lenfoma.

Hodgkin lenfomalı olguların %50'sinde (4/8) EBER, %37.5'inde (3/8) ise EBV-DNA pozitif olarak bulunmuş (Tablo III), mikst selüler tipte olan olguların %75'inde (3/4) ve lenfositten fakir olan bir olguda EBER pozitifliği izlenmiştir. NHL grubunda ise EBER ve EBV-DNA pozitiflik oranları sırasıyla %23.8 (5/21) ve %47.6 (10/21) olarak saptanmıştır (Tablo III).

Tablo III: Olguların Dokuda EBER ve DNA Sonuçları

Olgular	EBV-DNA Pozitif	EBER Pozitif	Toplam
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
HL (n: 8)	3 (37.5)	4 (50.0)	7 (87.5)*
NHL (n: 21)	10 (47.6)	5 (23.8)	15 (71.4)*
Toplam (n: 29)	13 (44.8)	9 (31.0)	22 (75.8)

* HL'lı 7 olgunun ikisinde ve NHL'lı 15 olgunun üçünde hem EBER hem EBV-DNA pozitifliği saptanmıştır.

B hücre kökenli 18 NHL olgusunun 4'ünde (%22.2) EBER, 9'unda (%50) EBV-DNA ve 10'unda EBER ve/veya EBV-DNA (%55.6) pozitifliği mevcuttur. T hücre kökenli 3 NHL olgusunun ise birinde EBER, birinde EBV-DNA saptanmış, istatistiksel analizde HL ve NHL grupları arasında EBER ve EBV-DNA pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.01$).

EBV-EA IgG pozitif 11 olgunun 4'ünde (%36.4), negatif 18 olgunun ise 5'inde (%27.8) EBER pozitifliği bulunmuş ve bu iki grup arasında EBER ve EBV-DNA pozitifliği açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.01$).

EBV-DNA testimizin 5 kopya/ml'ye kadar *Bam*HI-W bölgesini içeren plazmidi saptaması bu protokol için bildirilen duyarlılık ile (10 kopya/ml) uyumludur¹⁰.

TARTIŞMA

Değişik ülkelerde Hodgkin lenfoma ile EBV arasındaki ilişkinin, hasta dokularında viral nükleik asit ve viral protein testleri ile araştırıldığı çalışmalarda %20 ile %100 arasında değişen oranlar bildirilmektedir¹⁴⁻²³. Çok geniş bir aralıkta yer alan bu oranların, sosyoekonomik ve coğrafi farklılıklar gösterdiği izlenmektedir. Gelişmiş ülkelerde %30-50 arasında verilen oranlar, gelişmekte olan ülkelere %70-100'e ulaşmaktadır^{4,14-16}. Bizim çalışmamızda HL tanısı almış sekiz hastanın beşinde (%62.5) EBER ve/veya EBV-DNA pozitifliği belirlenmiştir. Bu ilişki Hindistan, Kenya ve Suudi Arabistan gibi ülkelere daha düşük olup, Meksika, Hong Kong, Japonya, Çin ve İtalya gibi ülkelere benzerdir. HL alt tiplerinden mikst selüler tipte dört olgumuzun üçünde (%75) saptadığımız EBER pozitifliği bir çok araştırmacının bildirdiği oranlara (%58-100) benzerdir^{4,14,15,17-20}. HL alt gruplarında EBV ilişkisi, mikst selüler tip ve lenfositlen fakir olan tiplerde %90'a varan oranlarda, nodüler sklerozan tipte %30 civarında ve lenfosit dominant tipte ise nadir olarak bildirilmektedir⁴. Lenfositlen fakir olan HL'da EBV ile ilişki %83-100 oranlarında bildirilmiştir^{4,14,18,20,21}. Çalışma grubumuzda lenfositlen fakir bir HL olgusunda EBER pozitifliği bulunmuştur. Çalışmamızda HL'lı olgularda saptanan %62.5'lik EBV nükleik asit pozitiflik oranı; Özdil ve arkadaşlarının²² Trakya'da EBER ISH yöntemiyle yaptıkları çalışmada bildirdiği oran (%68.2) ve Kaya ve arkadaşlarının²³ Kuzeydoğu Anadolu'da LMP-1'i araştırdıkları çalışmalarında bildirdiği oran (%75) ile uyumludur. Olgularımızın yarısını oluşturan mikst selüler alt tipinde %75 olarak saptadığımız EBV ilişkisi, söz edilen bu çalışmalarda sırasıyla %75 ve %100 olarak verilmektedir^{22,23}.

Çok farklı histolojik alt tiplerin yer aldığı NHL tanılı olgularımızda EBER ve/veya EBV-DNA pozitiflik oranı %57.1 (12/21) olarak belirlenmiş ve HL ile NHL grupları arasında EBER ve DNA pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.01$). NHL'lı hastalarımızdan yaygın büyük B hücreli lenfoma tanısı almış dokuz olgunun beşinde (%55.6) EBER ve/veya EBV-DNA pozitif olup, bunlardan sadece birisinde her iki test de pozitif sonuç vermiştir. Endemik Burkitt lenfoması ile EBV arasındaki ilişki %90'ın üzerinde olduğu halde, sporadik ve AIDS ile ilişkili Burkitt lenfomada bu oranlar %15-85'e düşmektedir. NHL'nın diğer alt tipleriyle ilgili çalışmalarda, farklı gruplar ve coğrafi bölgelerde %11.4 ile %100 arasında değişen farklı sonuçlar bildirilmektedir^{4,24-26}. İtalya'da yapılan bir çalışmada, difüz B hücreli lenfoma grubunda EBV-DNA pozitifliği %72.7 olarak bulunmuş ve foliküler lenfoma grubunda bu oranın %40 olduğu ifade edilmiştir²⁶. T hücre lenfomalarının EBV ile ilişkisi yine farklı alt gruplara bağlı olarak %40-100 arasında değişmektedir⁴. Çalışmamızda, NHL olgu grubunda da EBV ile olası bir ilişki düşünülebilir, ancak sağlıklı bir değerlendirme ve karşılaştırma için daha geniş sayıda NHL alt tiplerine ait olgu grupları ile, farklı bölgelerden ve aynı yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

Akut EBV enfeksiyonu olan hastaların yaklaşık %30-70'inde ortaya çıkan anti-EA antikoları, akut enfeksiyon sırasında yükselmekte ve 6-12 ay içinde kaybolmaktadır. Buna karşın yüksek anti-EA düzeyleri lenfomalı hastalarda saptanabilmektedir⁷. Çalışmamızda, anti-EA pozitif olgularda %36.4 (4/11), negatif olgularda ise %27.8 (5/18) oranında EBER ve/veya EBV-DNA pozitifliği belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum, primer enfeksiyon dışında bu tip hasta gruplarında (PTLD dahil) indirek bir tanı yöntemi olan serolojinin yararlı olmadığını desteklemektedir. Ayrıca antikor testlerinin HIV/AIDS'li olgularda görülen lenfoproliferatif hastalıkların tanısında da yeri kısıtlıdır. Bu olgu gruplarında moleküler yöntemlerle viral nükleik asitlerin gösterilmesi daha anlamlı olmaktadır.

Bilindiği gibi, bir etkenin bir hastalıkla ilişkisinin kesin olarak belirlenmesi; bu etkenin bu hastaya ait dokulardan izole edilmesi, bu izolatların verildiği kişide de aynı hastalığı oluşturmaması ve sağlıklı kişilerin dokularında bu etkenin olmadığını gösterilmesine dayanmaktadır. Ancak farklı lenfoma tipleri ile EBV arasındaki ilişkinin bu tip çalışmalarda kanıtlanması mümkün değildir. Çalışmamızda sağlıklı bireylerden doku örneği sağlanamadığı için sağlıklı doku kontrol grubu oluşturulamamıştır. Literatürdeki sağlıklı bireylere ait EBV nükleik asit çalışmaları genellikle periferik kan hücrelerinde araştırılmıştır^{10,27}.

Sonuç olarak, HL ve NHL etiyojisinde sorgulanan ve coğrafi bölgelere göre farklılık gösteren EBV nükleik asit varlığının, yöremizdeki lenfomalı hasta dokularında da gösterilmiş olması, olası bir ilişkiyi düşündürmesi açısından yarar sağlayabilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamız için kantitasyonu bilinen pozitif EBV-DNA örneğini sağlayan Doç. Dr. Arzu Sayiner ve Prof. Dr. HGM Niesters'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Arman D: Epstein-Barr virus infeksiyonları, s: 505-511. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları*.1996. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
2. Wilke A, Arman D: Epstein-Barr virus infeksiyonları, s: 91-96. Bozkaya E (ed), *Klinik Viroloji ve Viral İnfeksiyonların Laboratuvar Tanısı*. 1996. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul.
3. Aydemir Ş, Erensoy S: EBV seroprevalansı: Bir alan çalışması. *İnfeksi Derg* 1999, 13: 275-280.
4. Rickinson AB, Kieff E: Epstein-Barr virus, p: 2397-2446. In: Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsh MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B (eds), *Virology*. 1996, 3rd ed. Lippincott-Raven Press, Philadelphia.
5. St George K, Rowe DT, Rinaldo CR: Cytomegalovirus, varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus, p: 410-449. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA (eds), *Clinical Virology Manual*. 2000, 3rd ed. ASM Press, Washington.
6. Berber S: Farklı lenfoma gruplarında Epstein-Barr virus seroprevalansı ve erken antijen antikorunun araştırılması. Uzmanlık Tezi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2000.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds): Human herpes viruses, p: 541-564. In: *Medical Microbiology*. 2005, 5th ed. Elsevier Mosby, Philadelphia.
8. Hess RD: Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004, 42: 3381-3387.
9. Naresh KN, Johnson J, Srinivas V, et al: Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed-Stenberg cells. *Ann Oncol* 2000, 11: 91-96.
10. Wagner HJ, Bein G, Bitsch A, Kirchner H: Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus- seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992, 30: 2826-2829.
11. Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck C, Ritter JH, Gaudreault-Keener MM, Storch GA: Epstein-Barr virus in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1995, 60: 547-554.
12. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, Roberts RL, Powderly WG, Storch GA: Detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 1580-1583.
13. Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positivities with PCR. *Nature (London)* 1989, 339: 237-238.
14. Chan JKC, Yip TTC, Tsang WYW, Lau WH, Wong CSC, Ma VWS: Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease occurring in an oriental population. *Hum Pathol* 1995, 26: 314-318.
15. Chapman ALN, Rickinson AB: Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998, 9 (Suppl 5): S5-16.
16. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al: Epstein-Barr virus- associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997, 70: 375-382.
17. Monterosso V, Zhou Y, Koo S, Glackin C, Bujan W, Medeiros LJ: Hodgkin's disease in Costa Rica: a report of 40 cases analyzed for Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1998, 109: 618-624.
18. Zarate-Osorno A, Roman LN, Kingma DW, Meneses-Garcia A, Jaffe ES: Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein-Barr virus sequences and correlation with histological subtype. *Cancer* 1995, 75: 1360-1366.
19. Dirnhofer S, Angeles-Angeles A, Ortiz-Hidalgo C, et al: High prevalence of a 30-base pair deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. *Hum Pathol* 1999, 30: 781-787.
20. 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: 949-955.

21. Liu SM, Chow KC, Chiu CF, Tzeng CH: Expression of Epstein-Barr virus in patients with Hodgkin's disease in Taiwan. *Cancer* 1998, 83: 367-371.
22. Özdil A, Doğanay L, Demir M, Özpuyan F, Bilgi S: Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease in Trakya region of Turkey by in situ hybridization. *Tur J Haematol* 2002, 19: 461-464.
23. Kaya H, Erman Z, Gündoğdu C, Tekin SB, Gündoğdu M: Epstein Barr virus in Hodgkin's disease patients in Northeast Anatolia. *Tur J Haematol* 2000, 17: 61-65.
24. Iamaroon A, Pongsirivet S, Mahanupab P, Kitikamthon R, Pingtong J: Oral non-Hodgkin lymphoma: studies of EBV and p53 expression. *Oral Dis* 2003, 9: 14-18.
25. Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Sasaki Y, Abe M: The characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma: comparison between EBV positive and EBV negative cases in Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 2000, 91: 1233-1240.
26. Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, et al: Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003, 6: 109-118.
27. Decker LL, Klamon LD, Thorley-Lawson DA: Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol* 1996, 70: 3286-3289.