

Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalarda enzim işaretli floresan test ile elde edilen Epstein-Barr virüsü serolojik test sonuçlarının değerlendirilmesi

Evaluation of enzyme-linked fluorescent assay results for determining Epstein-Barr virus serology at Ege University Hospital

Soylu M Zeytinoğlu A Altuğlu İ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Epstein-Barr virüsü (EBV); enfeksiyöz mononükleoz, kronik aktif EBV enfeksiyonu gibi hastalık tablolarına, bazı malignitelere, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde lenfomalara ve transplant sonrası lenfoproliferatif hastalıklara sebep olur. Laboratuvarımıza EBV tanısı için başvuran olguların büyük çoğunluğu akut EBV enfeksiyon tanısı veya tarama amacıyla gelen olgulardan oluşmaktadır. Olguların bir kısmında karşılaşılan atipik profiller halen yorum açısından sorunludur.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na 01.01.2011-01.09.2013 tarihlerinde (32 ay) tarama amaçlı veya EBV enfeksiyonu ön tanısıyla yollanıp test edilen 7363 serum örneğinin sonuçları çalışmaya dâhil edilmiştir. EBV VCA IgM antikorları, EBV VCA/EA IgG antikorları, EBNA-1 IgG antikorları bioMérieux™ VIDAS® otomatik ELFA cihazında çalışılmıştır.

Bulgular: Çalışılan 7363 serum örneği yaş gruplarına göre analiz edilmiştir. Olguların 3567'i kadın ve 3796'i erkek olup yaş ortalamaları 26,77'dir (medyan değeri 20). Sırasıyla örneklerin %70.1'i geçirilmiş enfeksiyon, %13.1'i EBV ile karşılaşmamış, %1.5'i akut enfeksiyon, %5.1'i EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG negatif, %2.7'si EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG negatif, EBNA-1 IgG pozitif, %1.6'sı EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG pozitif ve %5.6'sı da diğer atipik profilleri kapsamaktadır.

Sonuç: Bu çalışmada, EBV ile karşılaşma oranı %81 olup toplumumuzdaki seropozitiflik ile uyumludur. Klinik yorum sorunu yaşanan atipik profil oranı %15'dir. Sorunlu olan EBV serolojisini değerlendirilmesi hastanın klinik izlemi ve serolojik izlemini gerektirmektedir. EBV enfeksiyonunun serolojik tanısında sorun olan atipik profiller diğer serolojik yöntemlerle de benzer oranlarda görülebilmektedir. Çok sayıda örnek gelen merkezlerde otomasyona uygunluğu, öznel olmaması ve hızlı sonuç vermesi nedeni ile EBV serolojik tanısında ELFA kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Epstein-Barr virüsü, enfeksiyonlar, serolojik testler.

Summary

Introduction: Epstein-Barr virus (EBV) causes infectious mononucleosis, chronic infection, some malignancies, lymphomas in immunosuppressive patients and lymphoproliferative diseases in post transplantation patients. The vast majority of the cases attending for EBV diagnosis in our laboratory; come with acute infection diagnosis or for serological screening. Few cases with atypical profiles for EBV still indicate doubtful results.

Materials and Methods: Between 01.01.2011-01.09.2013 (32 months), 7363 serum samples were included in the study. Serum samples were tested for EBV VCA IgM, VCA/EA IgG ve EBNA-1 IgG antibodies with bioMérieux™ VIDAS® automated enzyme-linked fluorescent assay instrument (ELFA).

Results: A total number of 7363 serum samples were analysed by age groups. Among these groups; 3567 patients were women and 3796 were men with the mean age of 26.77 years (the median value 20 years). Our findings were as follows: 70.1% past infection, 13.1% not infected with EBV, 1.5% acute infection, 5.1% [EBV VCA IgM negative, VCA/EA IgG positive, EBNA-1 IgG negative], 2.7% [EBV VCA IgM negative, VCA/EA IgG negative, EBNA-1 IgG positive], 1.6% [EBV VCA IgM positive, VCA/EA IgG positive, EBNA1 IgG positive] and 5.6% other atypical profiles.

Yazışma Adresi: Mehmet SOYLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 09.12.2013 Kabul Tarihi: 30.12.2013

Conclusion: In this study 81% of the patients were seropositive for EBV and this result was coherent with the previous results in our population. The ratio for atypical profiles that need to be explained was 15%. If there is a doubt in evaluation of EBV diagnosis, both clinical and serological follow up must be done. Because of its suitability of automation and objectivity of the results at EBV serological diagnosis, ELFA can be preferred by laboratories accepting large numbers of serum samples.

Key Words: Epstein-Barr virus, infections, serological tests.

Giriş

Epstein-Barr virüs (EBV); enfeksiyöz mononükleoz (IM), kronik aktif EBV enfeksiyonu gibi hastalık tablolarına, bazı malignitelere, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde lenfomalara ve transplant sonrası lenfoproliferatif hastalıklara sebep olur. Özgül olmayan heterofil antikor testleri, özgül EBV serolojik göstergeleri ve VCA IgG avidite testleri immün kompetan olguda tanı açısından önemli iken, viral genomun araştırılması (*EBV DNA ve EBV-encoded RNA [EBER]*) immün baskılanmış olgularda yol göstericidir.

EBV ile ilk kez karşılaşanlarda izlenen primer enfeksiyon genellikle immün kompetan bireyde asemptomatik seyrederek. Semptomatik hastalık tablosu ise ya minimal belirtilerle seyrederek ya da enfeksiyöz mononükleoz tablosu izlenir. Türkiye’de erişkin yaş grubunda seropozitiflik %70-99.4’tür (1,2).

İmmün kompetan hastada enfeksiyon tanısında immunfloresan (IFA), kompleman birleşmesi testi, enzim immünassay (EIA) ve immunoblot (IB) özgül serolojik testleri anlamlıdır. Bu testlerde viral lizat, rekombinant ve sentetik peptitler kullanılmaktadır. İlk olarak kullanılan IFA klasik ve altın standart olarak tanımlanırken EBV serolojisinin sorun olması nedeniyle daha sonradan; EIA, enzim işaretli floresan testi (ELFA), mikropartikül temelli immün assayler (MPTİ) ve immunoblot testleri geliştirilmiştir. Yöntem farklılıkları sebebiyle EBV serolojisinde henüz standardizasyon sorunu vardır. Her bir yöntemin sübjektif olması, duyarlılık/özellik sorunları ve örnek sayısının yüksek olduğu laboratuvar için otomasyona uygun olmaması gibi kısıtlılıkları vardır (3). Bunun dışında yine atipik profiller rutin tanıda yorum sorunları yaratmaktadır. Bu çalışmada duyarlılık ve özgülük açısından sorunlu olan IFA, EIA, MPTİ ve IB yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiş ticari bir EBV ELFA kiti ile elde edilen rutin deneyimlerin paylaşılması amaçlanmıştır.

Rutin laboratuvar çalışmalarında karşılaşılan olguların büyük çoğunluğunu akut veya geçirilmiş enfeksiyon olguları oluşturmaktadır; EBNA-1 IgG yokluğunda VCA IgM ve IgG’nin birlikte bulunması akut enfeksiyon, VCA IgG ve EBNA-1 IgG pozitifliğinde de VCA IgM’nin bulunmaması ise tipik bir geçirilmiş enfeksiyon profilidir (Tablo-1). Fakat olguların bir kısmında karşılaşılan atipik profiller hâlen yorum açısından sorunludur.

Tablo-1. EBV Enfeksiyonunda Tipik Serolojik Profiller ve Yorumları.

Anti EBV antikorları			Değerlendirme
VCA IgM	VCA IgG	EBNA-1 IgG	
Negatif	Negatif	Negatif	EBV virüsü ile karşılaşmamış
Pozitif	Negatif/Pozitif	Negatif	Akut enfeksiyon
Negatif	Pozitif	Pozitif	Geçirilmiş enfeksiyon

Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na 01.01.2011-01.09.2013 tarihleri arasında (32 ay) tarama amaçlı ve EBV enfeksiyonu ön tanısıyla VCA IgM, VCA/EA IgG ve EBNA-1 IgG EBV antikorları istenen 8256 serum örneğinin duplikasyonları değerlendirilmiş ve duplikasyonlar çıkarıldıktan sonra kalan 7363 serum örneği sonuçları çalışmaya dâhil edilmiştir. EBV VCA IgM antikorları bioMérieux™ VIDAS® EBV VCA IgM (Fransa), EBV VCA/EA IgG antikorları bioMérieux™ VIDAS® EBV VCA/EA IgG (Fransa) ve EBNA-1 IgG antikorları ise bioMérieux™ VIDAS® EBV EBNA-1 IgG (Fransa) kiti ile VIDAS® otomatik ELFA cihazında çalışılmıştır. Her üç antikorun negatif olanlar EBV ile karşılaşmamış, EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG pozitif olan örnekler geçirilmiş enfeksiyon ve EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG negatif olan örnekler ise akut enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bunlar dışındaki serolojik profiller ise atipik profiller olarak ele alınmıştır; bu profiller: [EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG negatif] ve [EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG negatif, EBNA-1 IgG pozitif] ve [EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG pozitif], diğer atipik profiller olarak ise [EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG negatif, EBNA-1 IgG negatif] ve [EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG negatif, EBNA-1 IgG pozitif] ve her bir profil için ayrı ayrı veya aynı anda sınır değerlerin bulunduğu profilleri kapsamaktadır.

Bulgular

Çalışılan 7363 serum örneğinin ELFA EBV VCA IgM, VCA/EA IgG ve EBNA-1 IgG sonuçları yaş gruplarına göre analiz edilip Tablo-2’de özetlenmiştir. Serum

örneklerinin alındığı olguların 3567'i kadın ve 3796'i erkek olup yaş ortalamaları 26,77'dir (medyan değeri 20). Sırasıyla örneklerin %70.1'i geçirilmiş enfeksiyon, %13.1'i EBV ile karşılaşmamış, %1.5'i akut enfeksiyon, %5.1'i EBV VCA IgM negatif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG negatif, %2.7'si EBV VCA IgM negatif, VCA/EA

IgG negatif, EBNA-1 IgG pozitif, %1.6'sı EBV VCA IgM pozitif, VCA/EA IgG pozitif, EBNA-1 IgG pozitif ve %5.6'sı da diğer atipik profilleri kapsamaktadır. Çalışmada EBV ile karşılaşma oranı %81 olup toplumumuzdaki seropozitiflik ile uyumludur. Atipik profiller ise toplamda %15 oranındadır.

Tablo-2. EBV Serolojik Profillerin Yaş Gruplarına Göre Dağılımı (n=7363).

YORUM	0-11 ay (yüzde)	1-18yaş (yüzde)	19-40yaş (yüzde)	41-70yaş (yüzde)	71yaş (yüzde)	TOPLAM
EBV ile karşılaşmamış	15 (%10.6)	926 (%27.5)	32 (%1.9)	9 (%0.5)	0 (%0)	982 (%13.3)
Geçirilmiş EBV enfeksiyonu	83 (%58.5)	1844 (%53.7)	1417 (%82.4)	1511 (%87.8)	308 (%88.5)	5163 (%70.1)
Akut Enfeksiyon	0 (%0)	81 (%2.4)	28 (%1.6)	2 (%0.1)	1 (%0.3)	112 (%1.5)
ATİPİK PROFİLLER						
VCA IgM(-) VCA/EA IgG(+) EBNA-1 IgG(-)	9 (%6.3)	173 (%5)	91 (%5.3)	85 (%4.9)	17 (%4.9)	375 (%5.1)
VCA IgM(-) VCA/EA IgG(-) EBNA-1 IgG(+)	15 (%10.6)	102 (%3)	44 (%2.6)	30 (%1.7)	8 (%2.3)	199 (%2.7)
VCA IgM(+) VCA/EA IgG(+) EBNA-1 IgG(+)	0 (%0)	71 (%2.1)	26 (%1.5)	14 (%0.8)	5 (%1.4)	116 (%1.6)
Diğer Atipik Profiller	20 (%14.1)	235 (%6.8)	82 (%4.8)	70 (%4.1)	9 (%2.6)	416 (%5.6)
TOPLAM SAYI	142 (%100)	3432 (%100)	1720 (%100)	1721 (%100)	348 (%100)	7363 (%100)

Tablo-3. Atipik Profillerde Olası Nedenler ve Yapılması Gereken İleri İncelemeler.

Atipik profil	Olası nedenler	İleri inceleme
İzole VCA IgM pozitifliği	<ul style="list-style-type: none"> VCA IgG'den daha erken pozitifleşme RF, otoantikorlar, CMV veya Parvovirüs B19 enfeksiyonu ile ilişkili antikorlar yalancı pozitifliği 	İmmunoblot yöntemi, heterofil antikorların bakılması veya EBV DNA'nın kanda saptanması
İzole VCA IgG pozitifliği	<ul style="list-style-type: none"> EBV VCA IgM akut enfeksiyonda VCA IgG'den 1-2 hafta sonra ortaya çıkabilir EBV VCA IgM akut enfeksiyonda düşük düzeyde olabilir (testlerde yalancı negatiflik) ya da hiç sentezlenmeyebilir Geçirilmiş enfeksiyonda EBNA1 IgG düşük düzeyde olabilir(testlerde yalancı negatiflik) ya da hiç sentezlenmeyebilir İmmün yetmezlikli hastalarda var olan antikor zaman içerisinde kaybolabilir 	IgG immünoblot, VCA IgG avidite testleri, viral genom araştırmaları, heterofil antikor testleri, testlerin tekrarı
EBNA-1 IgG, VCA IgG ve VCA IgM'nin birlikte pozitifliği	<ul style="list-style-type: none"> Yakın dönem enfeksiyon Primer enfeksiyonun geçiş fazı veya konvalesans dönemi Geçirilmiş enfeksiyonda IgM'nin persistansı Re-aktivasyona bağlı olarak VCA IgM ve EBNA-1 IgG'nin birlikte pozitifleşmesi CMV, Parvovirüs B19, <i>T. gondii</i>, hepatit A, HIV'e bağlı yanlış pozitiflik 	EBV IgM için immünoblot yöntemi, IgG antikorlu immünoblot testleri, VCA IgG aviditesi, EBV DNA'nın araştırılması
İzole EBNA1 IgG pozitifliği	<ul style="list-style-type: none"> İmmün baskılanmış bireylerde VCA IgG'nin görülüp VCA IgM veya EBNA-1 IgG'nin görülmemesi VCA IgG üretiminde yetersizlik meydana gelmesi veya antikorların zamanla kaybolması 	EA(D) IgG'nin pozitifliği, IgG için immünoblot yöntemi

Tartışma

Sorunlu olan EBV serolojisinin değerlendirilmesi hastanın klinik ve serolojik izlemine gerektirmektedir. EBV enfeksiyonunun serolojik tanısında sorun olan atipik profiller diğer serolojik yöntemlerle de benzer oranlarda görülebilmektedir (3). Atipik profillerin değerlendirilmesi Tablo-3'te özetlenmiştir.

İzole VCA IgM pozitifliği

1. VCA IgG'den daha erken pozitifleştiğinde izole VCA IgM pozitifliği erken dönem akut enfeksiyonu gösterir.
2. Romatoid faktör, otoantikolar, CMV veya Parvovirüs B19 enfeksiyonu ile ilişkili antikolar yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir (4).

EBV VCA IgM genellikle VCA IgG ile aynı zamanda ortaya çıkar. Özgül IgM antikorunun doğrulanması, immunoblot yöntemi, heterofil antikoların bakılması ve EBV DNA'nın kanda saptanması ile mümkündür. Akut enfeksiyon hastalarının %85'inde üç ay boyunca saptanan anti-EA(D) IgG de saptanabilir (5). Çalışmamızda rutin laboratuvar uygulamalarında izole VCA IgM pozitifliği oranı %0.3 (15/7363) olarak saptanmıştır.

İzole VCA IgG pozitifliği

1. Bazı olgularda EBV VCA IgM akut enfeksiyonda VCA IgG'den 1-2 hafta sonra ortaya çıkabilir.
2. Bazı olgularda EBV VCA IgM akut enfeksiyonda düşük düzeyde olabilir (testlerde yalancı negatiflik) ya da hiç sentezlenmeyebilir.
3. Hastaların yaklaşık %5'inde, geçirilmiş enfeksiyonda EBNA-1 IgG düşük düzeyde olabilir (testlerde yalancı negatiflik) ya da hiç sentezlenmeyebilir.
4. İmmün yetmezlikli hastalarda var olan antikor zaman içerisinde kaybolabilir.

Sonuç itibarıyla, izole VCA IgG profili, EBNA-1 IgG'nin kaybolduğu geçirilmiş enfeksiyonlu olgularda veya akut enfeksiyonda VCA IgM'nin gecikmiş veya erken kaybolmasıyla görülebilir. Bu tablo bazı kaynaklara göre rutin laboratuvar uygulamalarının yaklaşık %7'sinde, EBV ile karşılaşmış olguların %8'inde görülmekte ve bu oran ilerleyen yaşta antikor kaybı nedeni ile artmaktadır (6). Bizim rutin laboratuvar çalışmamızda da bu oran %5,1 oranında saptanmıştır.

EBNA-1 IgG, VCA IgG ve VCA IgM'nin birlikte pozitifliği

VCA IgM akut enfeksiyondan sonra birkaç ay daha pozitif kalabilir, ayrıca EBV re-aktivasyonunda da ortaya çıkabilir. Sonuç olarak EBNA-1 IgG, VCA IgG ve IgM aynı anda şu hasta gruplarında pozitif görülebilmektedir:

1. Yakın dönem enfeksiyon
2. Primer enfeksiyonun geçiş fazı
3. Konvalesans dönemi veya geçirilmiş enfeksiyonda IgM'nin kalıcı olması,

4. Re-aktivasyona bağlı olarak VCA IgM ve EBNA-1 IgG'nin birlikte pozitifleşmesi sonucunda görülebilmektedir. Re-aktivasyon immünitesi sağlam kişilerde halen nadir ve genellikle kısa süren, klinik olarak önemsiz bir tablodur fakat immün yetmezlikli olgularda ciddi komplikasyonlara yol açabilir.

Bu serolojik tablo nadir görülmektedir, fakat bazı kaynaklarda rutin laboratuvar uygulamalarının yaklaşık %5'i olarak bildirilse de (6), çalışmamızdaki veriler ışığında bu oran %1.6 (116/7363) olarak saptandı.

Ek olarak, testin belirli bir süre sonra tekrar edilmesi de antikor profillerindeki değişikliklerin saptanmasına olanak sağlar. Bazı enfeksiyonlarda (CMV, Parvovirüs B19, Toxoplasma gondii, Hepatit A veya HIV) VCA IgM yalancı olumlulukları görülebilmektedir (8). VCA IgG aviditesinin bakılması özellikle faydalıdır, düşük avidite seviyeleri yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyonlara işaret ederken, yüksek avidite seviyeleri geçirilmiş enfeksiyon ve re-aktivasyon lehine yorumlanmalıdır (9-10).

Heterofil antikoların kullanımı tartışmalıdır çünkü bazı çalışmalarda yüksek duyarlılık oranlarından bahsedilirken (geçici enfeksiyonların %94'ü) (7), bazı çalışmalarda da EBNA-1 IgG, VCA IgG, VCA IgM ve heterofil antikoların birlikte pozitif olduğu çok az olgu bildirilmiştir (11).

EBV DNA'nın araştırılması re-aktivasyonun tanısında faydalıdır fakat tek bir viral yük çalışmasıyla re-aktivasyon tanısı konulamaz, kandaki viral yükün zaman içerisindeki seyrini bilmek gereklidir. Sonuç olarak; EBV DNA hem re-aktivasyon hem primer enfeksiyonda kanda pozitif bulunmakla birlikte bu ikisinin ayrımı tek bir örnekten çalışılan test ile mümkün değildir (12).

İzole EBNA-1 IgG pozitifliği

VCA IgM genellikle VCA IgG ile aynı zamanda ortaya çıkar fakat IgM birkaç hafta içerisinde kaybolurken, VCA IgG bireylerde ömür boyu pozitif kalmaktadır. EBNA-1 klinik bulguların başlangıcından itibaren genellikle 3-4 haftalık bir süreyle saptanamaz (13).

İmmün baskılanmış bireylerde VCA IgG'nin görülüp VCA IgM veya EBNA-1 IgG'nin görülmemesinden çokça bahsedilmiş (13,14); fakat VCA IgG'nin yokluğunda EBNA-1 IgG'nin pozitif olmasına imkânsız gözle bakılmıştır (15). Bununla beraber rutin laboratuvar uygulamalarında tüm EBNA-1 IgG pozitif serolojisi bulunan olguların %5.3'ünde izole EBNA-1 IgG pozitifliği olduğu bildirilmiştir (16). Kendi laboratuvarımızdaki çalışmamızda bu oran %2.7 olarak saptanmıştır (199/7363).

Yakın zamanda geliştirilen farklı test yöntemleri, EBV enfeksiyonu tanısında ilerleme kaydedilmesini sağlamıştır. Laboratuvarında uygulanacak test yönteminin seçilmesinde testin bilimsel ve teknik olarak uygunluğu, ekonomik imkanlar (maliyetler arası farklılıkların sosyal güvenlik kurumları tarafından karşılanabilirliği), laboratu-

varın fiziksel şartlarının uygunluğu ve yeterli eğitilmiş personelin varlığı gibi çeşitli etkenler göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç

Bu çalışmada, EBV ile karşılaşma oranı %81 olup toplumumuzdaki seropozitiflik ile uyumludur. Klinik yorum sorunu yaşanan atipik profil oranı %15'dir. Sorunlu olan EBV serolojisini değerlendirilmesi hastanın klinik izlemi

ve serolojik izlemini gerektirmektedir. EBV enfeksiyonunun serolojik tanısında sorun olan atipik profiller diğer serolojik yöntemlerle de benzer oranlarda görülebilmektedir (3).

Çok sayıda örnek gelen merkezlerde otomasyona uygunluğu, öznel olmaması ve hızlı sonuç vermesi nedeni ile EBV serolojik tanısında ELFA kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Aydemir Ş, Erensoy S. Epstein-Barr virüsün seroprevalansı: Bir alan çalışması. *İnfeksiyon Dergisi* 1999;3(13):275-80.
2. Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein Barr Virüs (Lymfocryptovirus, HHV-4). In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 2.cilt, 3.Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri; 2008:1672-79.
3. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol* 2012;1(1):31-43.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Bauer G. The rational basis for efficient Epstein-Barr virus (EBV) serology. *Clin Lab* 1995;4(41):623-34.
15. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3381-7.
16. García T, Tormo N, Gimeno C, Navarro D. Assessment of Epstein-Barr virus (EBV) serostatus by enzyme immunoassays: Plausibility of the isolated EBNA-1 IgG positive serological profile. *J Infect* 2008;57(4):351-3.