LLM Dergi 2023;7(1):1-13 • 10.5578/llm.20229901

DERLEME

Epstein-Barr Virüs (EBV) İlişkili Neoplastik ve Nonneoplastik Lenfoproliferatif Hastalıklarda Patologlar Tanı Sürecinde Nasıl İlerlemelidir?

How Pathologists Should Proceed in the Diagnosis of Epstein-Barr Virus (EBV) Related Neoplastic and Nonneoplastic Lymphoproliferative Diseases?

Ezgi Dicle SERBES, Seher YÜKSEL, Işınsu KUZU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Erişkin toplumun %90'ından fazlasını enfekte ettiği tahmin edilen, bilinen ilk onkojenik virüs olan Epstein-Barr virüs (EBV), reaktif ve neoplastik çok sayıda lezyon ile ilişkilendirilmiştir. Bu lezyonların ayırıcı tanısında ve EBV ile ilişkilerinin gösterilmesinde, patoloji en temel basamaklardan birini oluşturmaktadır. Ayırıcı tanıda, histomorfoloji, in situ hibridizasyon (ISH) ile EBER boyanma paterni ve immünhistokimyasal belirteçlerin önemi bulunur. Ancak immün yetmezlik ve lezyonlarla ilgili farkındalığın yerleşmemiş olması gibi bazı durumlarda ayrım güçlüğü ve tanısal zorluk yaşanabilmektedir. Bu derlemede, geniş bir literatür taraması eşliğinde, EBV'nin viral özellikleri, ilişkili olduğu bazı lezyonlar, bu lezyonların histopatolojik, immünhistokimyasal ve moleküler ayırıcı tanısı tartışılacak; ayrıca "Bir patolog ne zaman EBV ilişkili lezyondan şüphelenmelidir?", "Hangi immünhistokimyasal ve moleküler tetkikleri uygulamalı ve bunları nasıl yorumlamalıdır?" soruları yanıtlanacaktır.

Anahtar Kelimeler: Epstein-barr virüs; Lenfoid proliferasyon; Lenfoma

ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) is the first known oncogenic virus which affects more than 90% of the adult population. It has been associated with broad spectrum of lesions ranging from self-limiting reactive proliferations to malignant neoplasms. Pathological examination is a fundamental step in differential diagnosis and demonstration of the viral involvement. Although histomorphology, immunohistochemistry and EBER staining by in situ hybridization (ISH) are essential and helpful, in some difficult cases. The diagnosis could be difficult even for experienced pathologists. In this review, viral features of EBV, some of the associated lesions, histopathological, immunohistochemical and molecular characteristics of these lesions will be discussed with a wide literature review. Moreover, some questions such as; "When should a pathologist suspect EBV?", "Which immunohistochemical and molecular tests should be performed and how to interpret them?" will be answered.

Key Words: Epstein-barr virus; Lymphoid proliferation; Lymphoma

Makale atıfı: Serbes ED, Yüksel S, Kuzu I. Epstein-Barr Virüs (EBV) ilişkili neoplastik ve nonneoplastik lenfoproliferatif hastalıklarda patologlar tanı sürecinde nasıl ilerlemelidir? LLM Dergi 2023;7(1):1-13.

Yazışma Adresi

Dr. Ezgi Dicle SERBES

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı,
Ankara-Türkiye

Geliş: 11.11.2022 - **Kabul:** 03.03.2023

E-posta: ezgidk@gmail.com

GİRİŞ

Epstein-Barr virüs (EBV), Yvonner Barr, Bert Achong ve Anthony Epstein tarafından 1964 yılında tanımlanmıştır (1). EBV, gama herpesvirüs ailesinin bir üyesidir, eski adı HHV4'tür (Human herpesvirus 4). Bilinen ilk onkojenik virüstür. Yetişkin popülasyonun %90'ından fazlasını enfekte ettiği tahmin edilmektedir. Çift zincirli lineer DNA içeren, 172 baz çiftine sahip, 85'ten fazla gen kodlayan, zarflı bir virüstür. Yüz altmış iki kapsomerli nükleokapsid, zarf ve nükleokapsid arasında protein tegüment ve eksternal glikoprotein "spike" içermektedir (2). Tek hostu insandır. İnsan vücuduna girişi çoğunlukla bir hosttan diğer hosta tükürük yoluyla gerçekleşir. Primer enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik geçirilir, asemptomatik olmadığı vakalarda en sık neden olduğu klinik tablo akut enfeksiyöz mononükleozdur. Yaş arttıkça, immün sistemdeki değişikliklere bağlı olarak EBV enfeksiyonu daha ağır seyredebilmektedir. İnsanları enfekte eden iki subtip tanımlanmıştır; EBV1 ve EBV2. Bu subtipler, EBV nükleer antijeni kodlayan genlerdeki, özellikle EBNA2 sekanslarındaki organizasyon farklılıklarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Dünyada en sık rastlanan subtip EBV1'dir. EBV2'nin de EBV1 kadar yaygın olduğu Afrika toplulukları mevcuttur. İn-vitro koşullarda EBV-2'nin, B hücrelerini ölümsüzleştirme yeteneğinin EBV-1'den daha etkisiz olduğu gösterilmiştir (3).

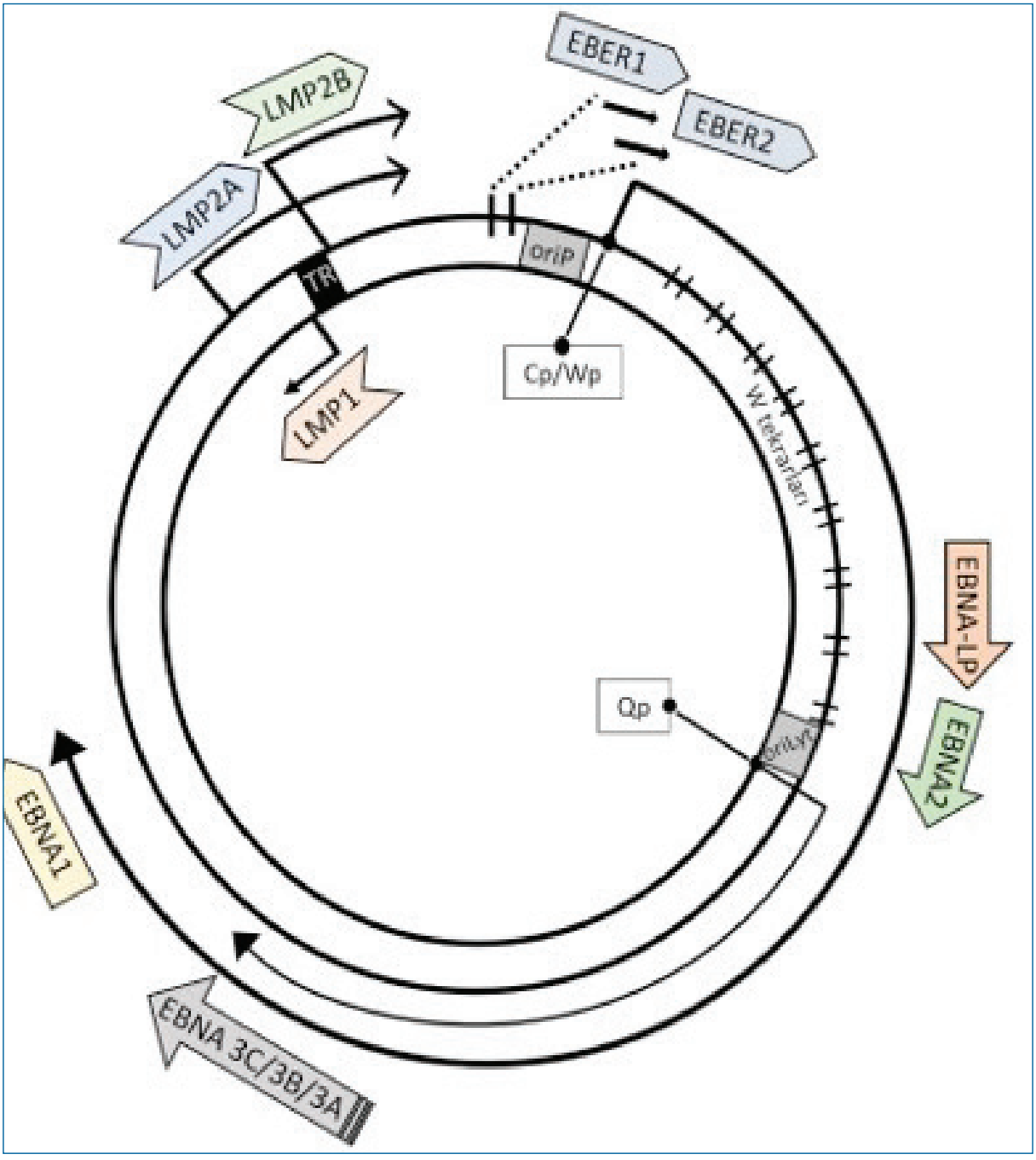
EBV insan vücudunda litik ve latent enfeksiyona yol açar. Litik enfeksiyon, viral replikasyonun gerçekleştiği, host hücrelerinin lizise uğradığı ve virüsün yayıldığı orofarengeal enfeksiyon aşamasıdır. Çoğu bireyde asemptomatik seyreder. Latent enfeksiyon ise virüsün bulunduğu hücreyi ölümsüzleştirdiği, hücre içinde saklanarak immün sistemden gizlendiği, ömür boyu süren enfeksiyon aşamasıdır. EBV'nin çift zincirli lineer DNA'sı, hücre EBV ile enfekte olduktan sonra, host nükleusuna taşınır, epizomal formuna dönüşür ve artık nükleusta kalıcıdır (Şekil 1) (4). Latent enfeksiyondan epizomal genom sorumludur. EBV genomunda çeşitli nükleer proteinler, membran proteinleri, viral sitokinler ve ribonükleik asitler kodlanmaktadır. EBV genomunda kodlanan proteinlerin çoğu, transkripsiyon faktörlerini taklit ederek temel hücresel yolakları kullanırlar. Bu yolaklardaki ek mutasyonlara bağlı veya immün yetmezlik sebebiyle oluşacak disregülasyonlar durumunda neoplastik transformasyona katkıda bulunurlar (5). EBV genomunda kodlanan proteinler ve immün yetmezlikler dışında, tümör patogenezinde araştırılan başka kofaktörler de mevcuttur. Özellikle enfekte B lenfositlerde proliferasyona neden olabilecek faktörler suçlanmaktadır. Örneğin endemik Burkitt vakalarında, malaryaya bağlı tekrarlayan ataklar ile oluşan immün aktivasyona bağlı, EBV ile enfekte ve neoplastik olabilecek hücrenin çoğalma şansının arttığı, kronik enflamasyon ve başka enfeksiyonların da benzer sebeple onkogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (6). Bunlar henüz kanıtlanmamış hipotezler olmakla birlikte, neoplazilerin çok faktörlü geliştiği düşünüldüğünde, B hücre çoğalmasına neden olabilecek ek faktörlerin patogenezde eşlik etmesi araştırmaya değer bulunmaktadır.

2. EBV ÜRÜNLERİ

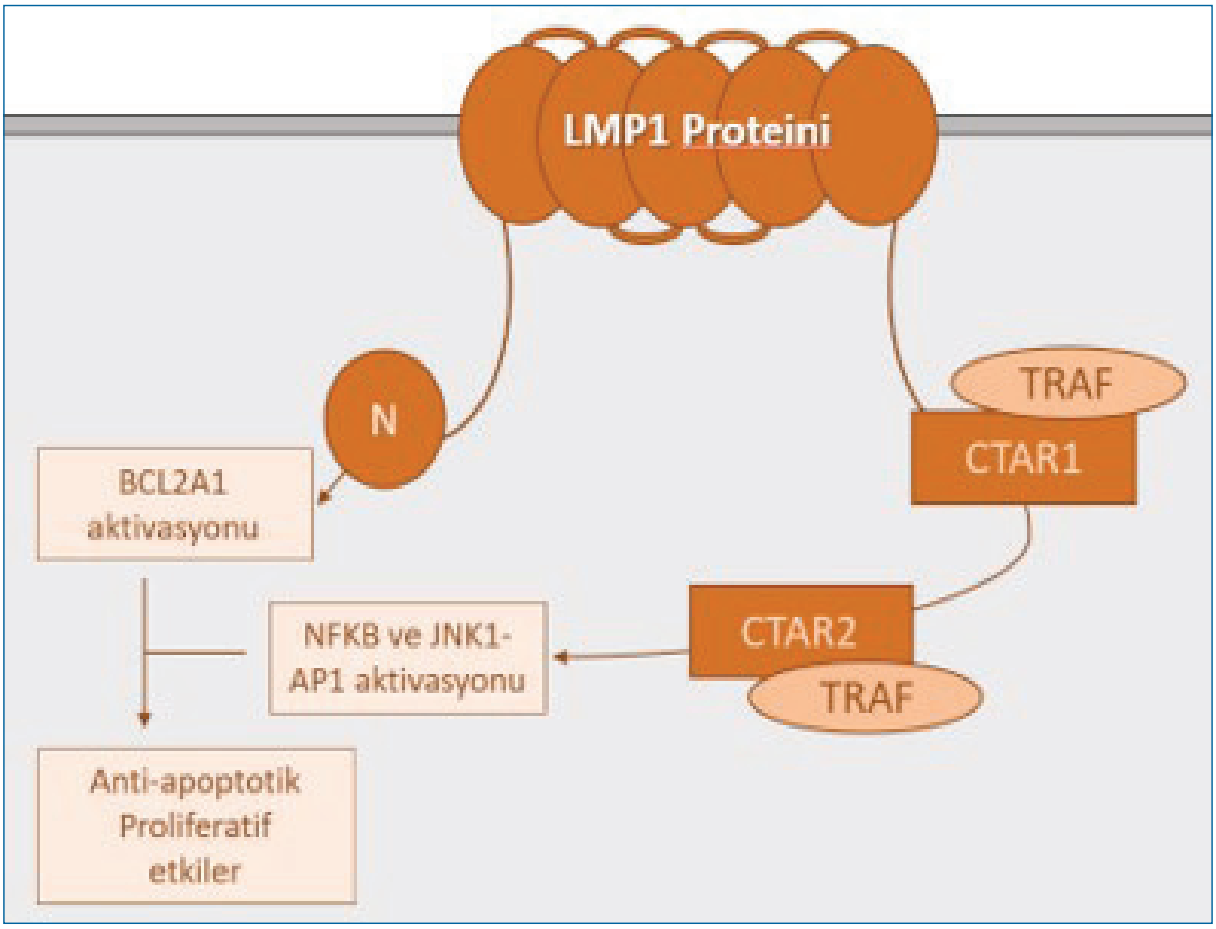
2.A. EBV Nükleer Antijen-1 (EBNA-1): EBNA-1, EBV genomunun replikasyonu ve bakımı için gerekli olan DNA bağlayıcı bir fosfoproteindir. Latent enfeksiyonunun sürdürülmesinde merkezi bir role sahiptir. Çoğalma sırasında, viral genomun hücrelerdeki kalıcılığını ve epizomal formun korunmasını sağlar (7). MYC, TP53 ve MDM2 üzerinden antiapoptotik etkileri mevcuttur. Aynı zamanda LMP1 üzerinde de aktivasyon yaparak LMP1'in etkisini artırır. EBNA1'in yapısında yer alan çeşitli aminoasit bölgeleri onu proteazlara dirençli kılar. Bu durum virüsün, MHC-I ile gerçekleşmesi beklenen antijen sunumundan ve dolayısıyla sitotoksik T lenfositlerden kaçmasına katkıda bulunur. Dolayısıyla tüm latent evrelerde ifade edilen tek viral proteindir (3).

2.B. EBV Nükleer Antijen-2 (EBNA-2): EBNA2 viral gen ifadesini düzenleyen ve aynı zamanda hücre ölümsüzleşmesinde kritik rol oynayan 300'den fazla hücre genini de transaktive eden bir transkripsiyonel koaktivatördür. EBNA-2, EBV enfeksiyonundan sonra saptanan ilk latent proteinlerdendir. Öncelikle viral ve hücresel genlerin ifadesine hizmet eder. B hücreli lenfoproliferasyonlarda önemli olabilecek MYC gibi veya T hücreli lenfomalarda önemli olan Notch sinyal yolağı gibi proliferatif yolaklarda aktivasyona neden olabilir (3,8).

2.C. Latent Membran Proteini-1 (LMP1): LMP1, hücre zarında yerleşimlidir. Farelerde B hücreli lenfomaya yol açtığı gösterilmiştir, lenfoid olmayan hücrelerde de onkojenik olabileceği kanıtlanmıştır. BCL2 ifadesinde artışa yol açması yanı sıra, TNF reseptör ailesinden CD40 reseptörü gibi davranarak, B lenfositlerdeki sinyal yolaklarında ligand bağımsız aktivasyona yol açtığı bilinmektedir (9). LMP1'in plazma membranı içindeki birikimi hücre içi sinyalizasyonlarda önemlidir. Yapısal olarak, liganddan bağımsız aktif bir reseptör gibi çalışır. N terminal ucu BCL2 üzerinden antiapoptotik etki gösterir (Şekil 2). CTAR1 ve CTAR2 (C terminal activating region 1, 2), C terminal uçta bulunan iki etkinleştirme bölgesidir. CTAR1, primer B hücresi transformasyonunda gereklidir. CTAR2, EBV pozitif B hücrelerinin proliferasyonu için önemlidir. İkisi de nükleer faktör kappa beta (NFKB), c-Jun N-terminal kinaz yolaklarını etkinleştirebilir ve antiapoptotik etki gösterebilir. JAK/STAT, MAPK yolaklarında aktivasyon yaptıkları gösterilmiş olan başka CTAR'lar da mevcuttur (10). LMP1'in ilişkili olduğu hücresel yolakların anormal düzenlenmesi EBV ilişkili proliferasyonlara katkı sağlar (3,5,6,11).



Şekil 1. *Çift sarmallı EBV genomunun epizomal formu. Plazmid replikasyon orijini (oriP), litik replikasyon orijini (oriLyt) ve viral latent genlerin genomdaki yerleşimleri gösterilmiştir. Okların uçları transkripsiyon yönünü temsil etmektedir. W fragmanlarının tekrarlanan ekzonlarından EBNA-LP ve EBNA2 transkripsiyonu gerçekleştirilir. LMP2 terminal tekrar (TR: Terminal repeat) bölgesinin her iki tarafında yer alan çoklu ekzonlardan oluşur. Terminal tekrar bölgesi, lineer genomun sirkülarizasyonu sırasında oluşur. Noktalı çizgilerin arasında kalan bölge, latent EBV enfeksiyonunun bir özelliği olan EBER transkripsiyon bölgesini göstermektedir. En dıştaki daha uzun çizgi, Cp veya Wp promotöründen transkribe olan tüm EBNA'ları içermektedir. Aynı uzun primer transkriptten, farklı "splicing" sonucu farklı EBNA'ları kodlayan mRNA'lar üretilir. İçteki daha kısa ok işareti, Qp promotöründen köken alan EBNA1 transkriptini göstermektedir (7).*



Şekil 2. *LMP1 ilişkili hücresel yolaklar. Altı adet transmembranöz segment içeren integral membran proteinidir. LMP1, N terminal ucu ve transmembranöz segmentleri sayesinde plazma membranında birikerek, C terminal ucundaki CTAR etkinleştirme bölgeleri aracılığı ile ligand bağımsız aktif bir reseptör gibi çalışır. LMP1, EBV enfekte B hücresinin transformasyonu ve proliferasyonu için gerekli hücre içi sinyalizasyonlarda önemlidir (10).*

CTAR: C terminal activating region, TRAF: TNF receptor-associated factors.

2.D. EBV Nükleer Antijen-3 (EBNA3): İn-vitro çalışmalarda, EBNA3A ve EBNA3C'nin B hücre transformasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir ve transkripsiyonel düzenleyici oldukları düşünülmektedir (12).

2.E. Latent Membran Proteini-2 (LMP2): LMP2A ve LMP2B, yapıları birbirine benzeyen transmembran proteinlerdir. Ligand bağımsız B hücre reseptörü gibi davranarak B hücrelerinde çoğalma ve hayatta kalma ile ilişkili rollerinin olduğu bilinse de ikisinin de in-vitro B hücre transformasyonu için şart olmadığı gösterilmiştir. LMP2B'nin, daha çok LMP2A üzerinde düzenleyici olduğu düşünülmektedir ancak rolü net olarak aydınlatılamamıştır (3).

2.F. EBV Nükleer Antijen-Latent Protein (EBNA-LP): EBNA-5 olarak da bilinen EBNA-LP, EBNA-2 ile birlikte, B hücrelerinin EBV enfeksiyonu sırasında üretilen ilk viral proteinlerdendir. Hücresel proliferatif sinyal yolaklarının aktivasyonunda ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonunda EBNA2'nin etkilerini arttırıcı rolü olduğu ve EBV enfekte hücrenin ölümsüzleşmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (3,4).

2.G. EBV Tarafından Kodlanan Küçük RNA'lar (EBER): EBER'ler ise EBV tarafından kodlanan RNA'lardır. Kesin fonksiyonları bilinmemektedir, transformasyon için gerekli olmadıkları gösterilmiştir (13). Tüm latent evrelerde ifade edilirler. Doğal immün yanıtta, virüs kalıcılığında rol alabilecekleri ve malignite gelişiminde henüz bilinmeyen rolleri olabileceği düşünülmektedir (3). EBV varlığını göstermede en güvenilir belirteçlerdir ve en duyarlı olarak in situ hibridizasyon ile saptanırlar.

2.H. BART (Bam A Rightward Transcripts) miRNA: Çekirdekte yerleşirler, Notch sinyal yolağında düzenleyici etkileri olabileceği, ayrıca; virüs kalıcılığında ve immün sistemden kaçışta rol alabildikleri düşünülmektedir (3).

2.J. BCRF1 (Viral IL-10): İnterlökin 10 (IL-10), antienflamatuvar bir sitokindir. Adaptif immün yanıt üzerinde baskılayıcı etkileri vardır. Viral IL-10'da bunun homologu

ve antienflamatuvar etkisi ile immün yanıttan kaçışta etkili olduğu düşünülen bir viral sitokindir. Bunun dışında insan homologları bulunan başka EBV viral genleri de vardır; BCL2 analogu olan BHRF1, siklin B1 analogu BDLF2 gibi (3,4).

3. LİTİK ENFEKSİYON, LATENSİ, REAKTİVASYON KAVRAMLARI

Primer EBV enfeksiyonu, çoğunlukla erken yaşlarda, asemptomatik geçirilmekle birlikte, adolesan veya daha ileri yaşlarda semptomatik seyrettiğinde en sık oluşturduğu tablo, ateş, tonsillit, servikal lenfadenopati, hepatosplenomegali ve lenfositoz ile karakterli akut enfeksiyöz mononükleozis tablosudur. EBV tükürükle oral yoldan bulaşır. Akut enfeksiyonda EBV, öncelikle orofarinksin çok katlı yassı epitelini enfekte eder, burada çoğalır ve litik enfeksiyona yol açar. Tonsil epitelinin altındaki "naive" B lenfositler de enfekte olur. Çok katlı yassı epitelin mi yoksa B lenfositlerin mi daha önce enfekte olduğu bilinmemektedir (4). Orofarengeal lenfoid dokulardaki B lenfositlerin enfekte olmasının ardından EBV, dolaşan hafıza B lenfositlerde latent kalır. İn-vitro çalışmalarda virüsün normal "resting" B lenfositleri ölümsüzleştirdiği ve onları sürekli çoğalan blastoid hücrelere transforme edebildiği gösterilmiştir (11,14). İn-vivo EBV enfeksiyonu ise çoğunlukla asemptomatik veya hafif tabloyla atlatılır çünkü sağlıklı bireylerde CD8 pozitif T lenfositler litik enfeksiyonu baskılar, akut tablonun ardından kanda viral yükü eser miktarlara indirirler. Sadece CD8 T lenfositler değil, CD4 T lenfositler ve NK hücreleri de immün yanıtta görev alır. EBV'ye spesifik immünglobulinler üretilir ve bu antikorlar, enfeksiyonun serolojik tanı ve takibinde kullanılır. Latent fazdaki hücreler, intermitan olarak litik faza girip virion salgılamaya ve tekrar tekrar B hücrelerini enfekte etmeye devam edebilir ve bulaştırıcılık yıllarca sürebilir. Bu aralıklı reaktivasyon sadece orofarinkste değil, vücutta herhangi bir mukozada gerçekleşebilir. EBV'nin çeşitli glikoproteinleri, B lenfositlerin membranında yer alan CD21 aracılığıyla B hücrelerini enfekte eder (15). Ancak B lenfosite nasıl ulaştığı aydınlatılamamıştır. Normalde orofarengeal epitel mikroorganizmalara karşı dirençlidir, tonsildeki çok katlı epitel bazı kript tabanlarında tek kata kadar inebilir. Bu tek katlı epitelyal alanlarda EBV'nin hücrelerin arasından geçebildiği ve B lenfosite ulaşabildiği düşünülmektedir. EBV temel olarak B lenfositleri enfekte etmesinin yanında, T lenfosit, NK hücreleri ve çeşitli epitelleri enfekte edebilir. Orofarengeal epiteli, kompleman reseptörleri, IgA aracılı endositoz veya membran füzyonu ile enfekte ettiği düşünülmektedir (15). T, NK hücrelerini nasıl enfekte ettiği bilinmemektedir.

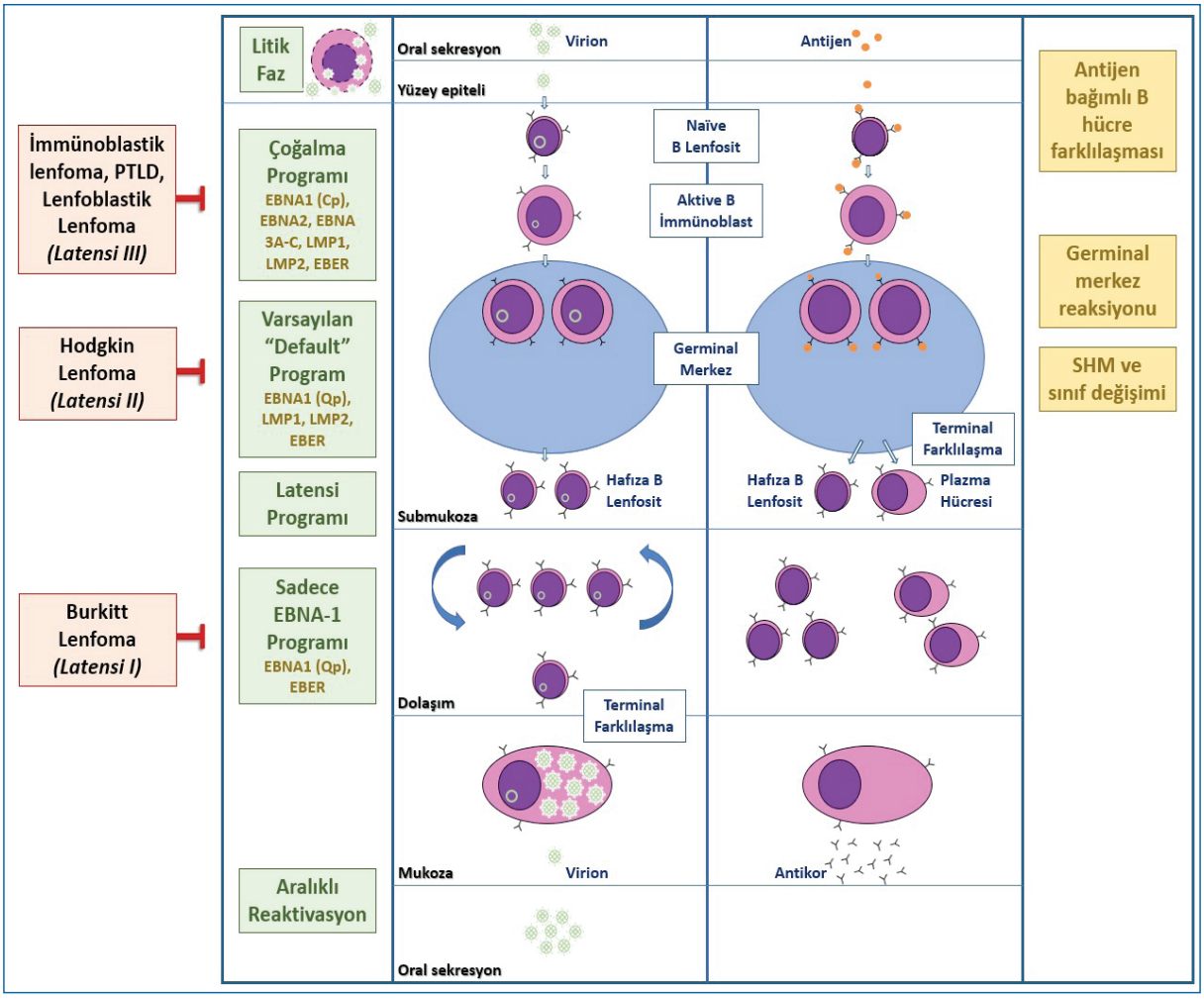
EBV biyolojisi aslında B hücre biyolojisini taklit eder (Şekil 3). Tonsil epiteli altındaki "naive" B lenfositler enfekte olduktan sonra aktive B immünoblastlara dönüşür ve çoğalmaya başlar. Bu aşamada "viral çoğalma programı" aktiftir. EBV enfekte B lenfositlerin prolifere olduğu, her çeşit viral ürünün sentezlendiği bir büyüme aşamasıdır. Ancak immün sistemin saldırısına da açık bir aşamadır. Dolayısıyla EBV genlerinde "downregülasyon" gerçekleşmeli, EBV enfekte hücre immün sistemden kaçmalıdır. Bu yüzden promotörlerde değişiklikler gerçekleşir, viral varsayılan "default" programı çalışır, enfekte hücreler germinal merkeze girer, bazı viral genler susturulur. Çeşitli kemokinler ve stromal hücrelerin oluşturduğu mikroçevrede EBV enfekte hücrenin germinal merkeze çağrılmasını sağlar. Enfekte hücreler germinal merkezde farklılaşıp hafıza B hücreleri olarak germinal merkezden çıkarlar. Latent virüsü ömür boyu taşıyan ölümsüz hafıza B lenfositlerde "sadece EBNA-1 programı" aktiftir, sadece EBNA1 ve EBER'ler sentezlenir (3).

EBV enfekte hücrelerin terminal farklılaşması ise B hücresinin plazma hücresine farklılaşması gibidir (Şekil 3). Çeşitli uyaranlar sebebiyle aralıklı olarak reaktive olup litik faza tekrar girebilir, immünglobulin salgılayan plazma hücreleri gibi mukozalarda virionlar salgılayarak yeni enfekte hücreler oluşmasına sebep olabilir (3).

EBV enfekte hücre bu aşamaların hangisinde neoplastik dönüşüm gösterirse, ona uygun viral ürünler sentezlenir. Bu ürünlerin immünohistokimya ve in situ hibridizasyon (ISH) ile tespiti tanı süreçlerinde kullanılmaktadır. Latensi 3, sürekli proliferasyonun gerçekleştiği lenfoblastik fazdır, bu fazda immün yanıt belirgindir, özellikle sitotoksik T lenfositler süreci kontrol altına almaya çalışır. İmmün yetmezlik durumlarında, hücre bu aşamada kontrol altına alınamaz. Dolayısıyla latensi 3 paternlerdeki tümörler, her türlü EBV ürününün sentezlendiği tümörlerdir. Latensi 1 ve 2'lerin izlendiği tümörlerin patogenezleri daha komplekstir. Latensi 3'e karşılık gelen prototipik tümörler lenfoblastik lenfomalar ve immün yetmezlik ilişkili tümörlerdir. Latensi 2'nin prototipi Hodgkin lenfoma, Latensi 1'in prototipi ise Burkitt lenfomadır (Şekil 3).

Patoloji laboratuvarlarında EBV latensi düzeyi ile ilgili yorum yapabilmek için en azından immünhistokimya ile EBNA2 ve LMP1, ISH ile EBER çalışılabilmesi gerekir. EBNA2 ve LMP1 negatif vakalarda, EBER ISH sayesinde latensi 1 saptanabilir. EBER ve LMP1 pozitif, EBNA2 negatif vakalarda latensi 2a saptanabilir. LMP1 negatif, EBNA-2 pozitif vakalarda latensi 2b saptanabilir. İmmünhistokimyasal olarak LMP1 ve EBNA2 ile boyanan, in situ hibridizasyon ile EBER pozitif olan vakalarda ise latensi 3 saptanabilir (Şekil 4) (16).

Reaktivasyon ise EBV enfekte hücrelerin bulunduğu lenfoid dokular veya mukozalarda, normal immün yanıttan kaçan hücrelerin çoğalmasıdır. Reaktivasyon genellikle immünsupresyon durumlarında veya klinik açık immünsupresif bir durum olmadan yaşlanma ilişkili immünitede azalmaya bağlı yaşlı hastalarda görülebilir. Nadiren immün yetmezliğin olmadığı durumlarda da reaktivasyon gözle-



Şekil 3. *EBV biyolojisi, viral programlar ve EBV latensi ile ilişkili prototipik lenfoproliferatif hastalıklar. EBV biyolojisi ve B lenfosit biyolojisi karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.*

PTLD: Post-transplant lymphoproliferative disease, SHM: Somatik hipermutasyon.

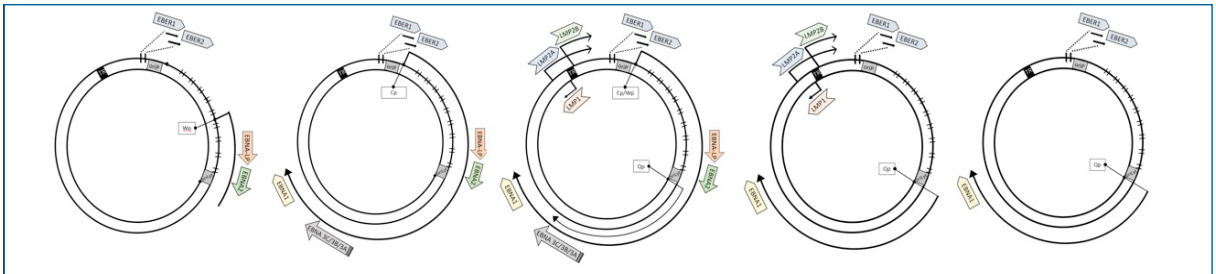
nebilir ancak patolog EBV reaktivasyonu düşündüğünde, hastanın immünsupresyon durumunun araştırılması açısından klinisyeni uyarmalıdır.

EBV reaktivasyonu polimorfik histolojik ve klinik özelliklere sahip EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalıklar şeklinde prezente olur. Polimorfik EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalıklar immünsupresyon durumu ortadan kalktığı zaman (örneğin; immünsupresif ilaç tedavisinin kesilmesi) gerileme gösterir. Ancak bu vakaların bir bölümü transforme olarak lenfomaya da ilerleyebilir.

EBV ilişkili polimorfik lenfoproliferasyonlarda izlenen histomorfolojik bazı özellikler, spesifik olmasa da patoloğu EBV ilişkisi açısından şüphelendirmelidir (Tablo 1). Klinik immünsupresyon öyküsünün uygunluğu durumunda, patolog EBER ISH ile lezyonun EBV ilişkisini göstermeli ve polimorfik proliferasyonlar ile lenfoma ayırıcı tanısını yapmalıdır.

4. EBV'DEN NE ZAMAN ŞÜPHELENELİM, NE YAPALIM, NASIL YORUMLAYALIM?

EBV ilişkili lenfoproliferasyonlar, reaktif süreçlerden malignitelere çok geniş spektrum sergiler. Bu lezyonların ayırıcı tanısı sadece histopatolojik değerlendirmeyle yapılamaz, klinik öykünün ve takipteki verilerin bildirilmesi olmazsa olmazdır. Patoloğun hangi vakada EBV ilişkisinden şüpheleneceğini ve yardımcı immünhistokimyasal ve/veya moleküler teknikleri kullanacağını bilmesi, hem dokunun hem kaynakların verimli kullanımı için strateji belirlemesi açısından gereklidir. Klinik bilgi eksikliği, doku ve kaynakların uygun yardımcı teknikler için verimli kullanılamaması, EBV ilişkili lezyonlara yaklaşımda patologlar için ciddi zorluk oluşturabilmektedir. Yazının bundan sonraki kısmında yanlış malign veya yanlış benign tanı verilme olasılığı yüksek bulunan EBV ilişkili nonneoplastik ve neoplastik lenfoproliferasyonlar için patolojik yaklaşıma değinilecektir.



Prelatent Faz	Latens IIb	Latens III	Latens IIa	Latens I
Kodlanmayan RNA: EBER BHRF1 miRNA BART miRNA	**Kodlanmayan RNA:** EBER BHRF1 miRNA BART miRNA	**Kodlanmayan RNA:** EBER BHRF1 miRNA BART miRNA	**Kodlanmayan RNA:** EBER BART miRNA	**Kodlanmayan RNA:** EBER BART miRNA
mRNA: EBNA-LP EBNA2 Wp-BHRF1 (vBcl2)	**mRNA:** EBNA-LP EBNA2 EBNA3 EBNA1 Wp-BHRF1 (vBcl2)	**mRNA:** EBNA-LP EBNA2 EBNA3 EBNA1 LMP1 LMP2A LMP2B Wp-BHRF1 (vBcl2)	**mRNA:** EBNA1 LMP1 LMP2A LMP2B	**mRNA:** EBNA1
Litik genler: ZTA, RTA, vBcl2, vIL10				
Hastalıklar: Litik enfeksiyon	**Hastalıklar:** • PTLD • AIDS ilişkili lenfomalar	**Hastalıklar:** • İmmünoblastik lenfoma • PTLD • AIDS ilişkili lenfomalar • Kronik enflamasyon ilişkili EBV pozitif DBBHL	**Hastalıklar:** • Hodgkin lenfoma • Nazofarengeal karsinoma • Ekstranodal NK/T hücreli lenfomalar	**Hastalıklar:** • Burkitt lenfoma • Primer efüzyon lenfoma • Plazmablastik lenfoma

Şekil 4. *EBV latensi, viral gen ifadesi ve ilişkili prototipik lenfoproliferatif hastalıklar (16).*

Tablo 1. Polimorfik lenfoproliferasyonda EBV şüphesine yol açan histomorfolojik ve immünhistokimyasal özellikler

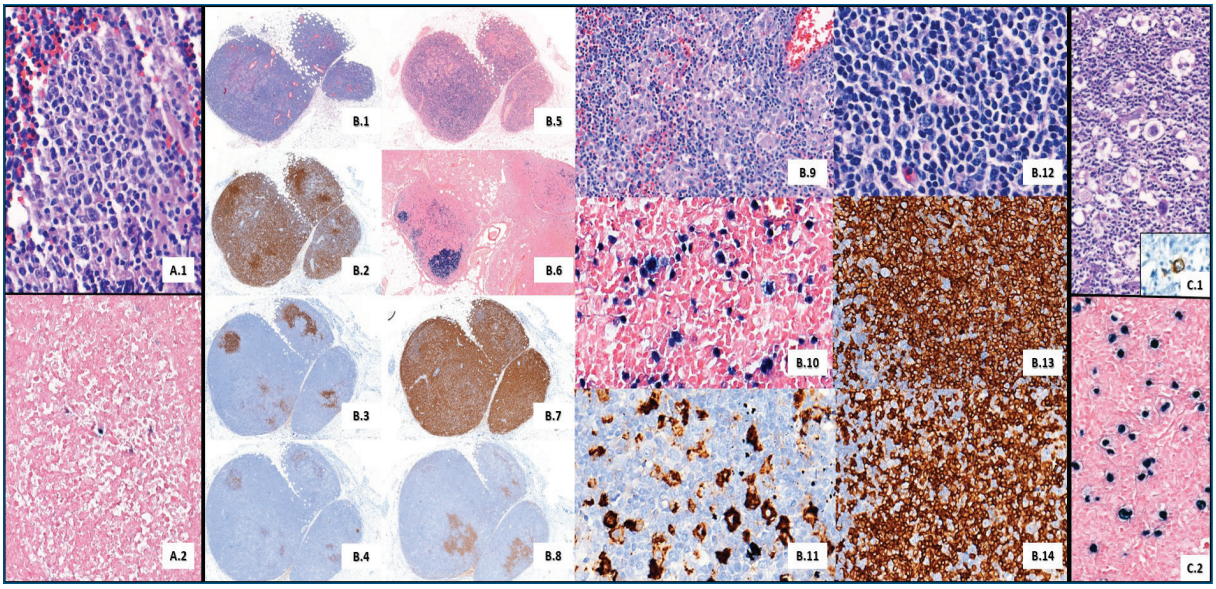
Nekroz
Epitelyal ülserasyon
Anjiotropik vaskülit benzeri lenfoid proliferasyon
Büyük hücrelerden zengin, Hodgkin-benzeri hücreler, plazmablast, plazma hücreleri içeren, arada CD8 pozitif T lenfositlerin de bulunabildiği polimorfik görünüm
CD30 ve zayıf CD20 ekspresyonu gösteren B blastik hücreler

4.A EBV İlişkili Reaktif Süreçlere Yaklaşım

4.A.1. EBV pozitif reaktif lenfoid hiperplazi: Primer EBV enfeksiyonu sonrasında, asemptomatik taşıyıcı hastanın normal veya minimal hiperplazi içeren lenf nodüllerinde, dağınık, küçük boyutlu, parakortikal yerleşimli, EBER pozitif az sayıda B lenfosit bulunabilir. Bunlar genelde folikül dışı alanlarda görülürler, nadiren folikül içinde de seyrek bulunabilirler. Lenf nodu yapısının korunmuş olması, atipik hücre izlenmemesi, EBER pozitifliğinin az sayıda ve küçük boyutlu hücrelerde olması histomorfolojik olarak neoplastik lenfoproliferatif lezyonlardan uzaklaştırır. Asemptomatik bireylerde mukoza ilişkili lenfoid doku ve akciğerde de EBER pozitif seyrek hücre izlenebilir (Resim 1) (17).

4.A.2. Primer EBV enfeksiyonu/akut enfeksiyoz mononükleozis: Primer EBV enfeksiyonunda, diğer EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalıklarda görülen histomorfolojik bulgular ile ortak özellikler izlenebilir. Bu nedenle lenfoma ile karışabilir. Ayrımda histomorfolojik ipuçları vardır ancak primer EBV enfeksiyonu, patolojinin tek başına karar verebileceği bir tanı değildir. Hastanın yaşının genç olması, immünsupresyon durumunun olmaması, en önemlisi serolojik sonuçlarının primer enfeksiyon ile uyumlu olması, IgM tipinde antikor bulunması beklenir.

EBV tonsilitinde polimorfik bir lenfoid infiltrasyon mevcuttur, belirgin plazmablastlar izlenebilir, nadiren Hodgkin benzeri hücrelere rastlanabilir. Akut enfeksiyöz mononük-



Resim 1. *Neoplastik veya nonneoplastik bazi lezyonların EBER in situ hibridizasyon ile boyanma paternleri gösterilmiştir.* ***A.*** *Reaktif lenfoid hiperplazi.* ***A.1.***, ***A.2****. Germinal merkezde seyrek EBER pozitif hücre izlenebilir.* ***B.*** *Akut EBV lenfadeniti.* ***B.1.*** *HE kesit ile genişlemiş trabeküler sinüsler, yer açık subkapsüler sinüsler, kortekste germinal merkezi belirgin folikül yapıları, parakortekste diffüz lenfoid hücre artışı ve vasküler proliferasyonu destekleyen morfolojik bulgular dikkati çekmektedir.* ***B.9.***, ***B.12.*** *Yakın incelemelerde sırasıyla, eşlik eden epiteloid histiosit grupları ve parakortikal alanlarda yer yer daha büyük, immünoblast görünümünde hücreler saptanmıştır.* ***B.2.***, ***B.13****. CD20 ile korunmuş germinal merkezler yanı sıra lenf nodülü içerisinde yer yer yaygın yer yer ise dağınık folikül yapılarını işgal eden B lenfositler mevcuttur.* ***B.3.***, ***B.4.*** *Sırasıyla CD21 ve CD23 ile FDRC'nin pek çok alanda korunduğu izlenmektedir.* ***B.5.***, ***B.6.***, ***B.10.*** *ile lenf nodüllerinde farklı yoğunlukta, yer yer dağınık az sayıda yer yer yoğun, büyük ve küçük boyutlu EBER pozitif hücrelerin varlığı gözlenmektedir.* ***B.7.***, ***B.14.*** *CD3 ile korunmuş foliküllerin olduğu alanlarda parakortekste ve lenf nodülü normal yapısının kısmen silindiği alanlarda T hücreleri çok belirgin olarak artmıştır ve zeminde hakim hücre popülasyonu meydana getirmektedir.* ***B.8.*** *IgD folikül yapıları çevresinde yoğunlaşmış mantle zon alanları yer yer seçilmektedir.* ***B.11.*** *CD30 normal yapısının korunduğu ve normal yapısının yer yer bozulduğu alanlarda değişik oranda dağınık veya yer yer yoğun pozitif hücreye rastlanmıştır.* ***C.*** *Hodgkin Lenfoma.* ***C.1****. EBV-LMP1 immünhistokimyası ve* ***C.2.*** *ISH ile neoplastik hücrelerdeki EBER boyanması gösterilmiştir.*

leozda etkilenen lenf nodüllerinde, immünoblastik proliferasyon, reaktif foliküler hiperplazi ve monositoid B hücre hiperplazi alanları izlenebilir. Prolifere immünoblastlar CD30 pozitiftir. Lenf nodülünde yapısal düzensizlik izlenebilir ve lenfoma ile karışmasına neden olabilir (17). Lokalizasyonun tonsil veya servikal lenf nodülü olması, hücreselliğin heterojen olması, az sayıda da olsa kalıntı hiperplastik germinal merkez izlenmesi, genişlemiş sinüslerin bulunması akut enfeksiyöz mononükleozu destekler. Ayrımda EBER ISH incelemesi değerlidir. Primer enfeksiyonda, çok sayıda küçüklü büyüklü pozitif hücreler ve aralarda negatif hücreler de izlenir. Lenfomalarda daha uniform ve daha çok sayıda pozitif hücre beklenir ama ayrım için EBER pozitif hücre miktarıyla ilgili bir eşik değer belirlenmemiştir. EBV pozitif hücrelerin çoğu B lenfosittir. Çoğunlukla parakortikal yerleşimlidir ancak germinal merkezlerde ve monositoid görünümlü odaksal B hücre alanlarında da dağınık pozitif hücreler bulunabilir. EBER ile boyanan immünoblastik hücreler, hücresel atipi yanında, immünohistokimyasal olarak EBV-LMP1 pozitifliği de gösterebilir, Hodgkin lenfomadan ayrım zorlaşabilir. Bu koşulda, klinik bilgi kritiktir. Patolojiye gelen materyalde, akut EBV lenfadeniti veya tonsilliti tanısının güvenle verilebilmesi için özellikle hastanın klinik öyküsü, EBV serolojisi ve kanda EBV viral yükünün bildirilmesi gerekmektedir. Genç hastada, tonsil veya servikal lenf nodülü değerlendiriliyor olması, hastanın bilinen immün yetmezliğinin olmaması, klinik tablonun değerlendirme sürecinde toparlaması, başvuruda kanda IgM tipinde antikorların olması, takipte IgM'nin negatifleşip, IgG'nin pozitifleşmesi akut enfeksiyöz mononükleozisi düşündürmelidir (Resim 1).

4.A.3. EBV pozitif hemofagositik lenfohistiositozis: Akut abartılı bir immün yanıt tablosudur. Primer EBV enfeksiyonunun nadir bir komplikasyonudur. Sistemik benign histiosit proliferasyonu ve hemofagositoz izlenir. EBER pozitif hücreler çoğunlukla küçük atipi içermeyen T lenfositlerdir. Eşlik eden az sayıda EBER pozitif B lenfosit de bulunabilir. Viral EBV yükü kanda yüksektir. B hücreleri de enfekte olabilir ama asıl T ve NK hücreleri enfektedir. CD8 pozitif T lenfositlerin enfeksiyonuna bağlı sitokin fırtınası, histiosit ve makrofajlarda aktivasyona yol açar (17).

4.B. EBV İlişkili Neoplastik Olmayan Ancak Malignite Potansiyeline Sahip Lezyonlara Yaklaşım

4.B.1. Kronik aktif EBV enfeksiyonu (CAEBV): Genellikle bilinen, immün yetmezliği olmayan hastalarda akut EBV enfeksiyonunu takiben üç aydan uzun süren persistan enfeksiyon tablosudur (18). Perifer kanında yüksek EBV-DNA titreleri mevcuttur ve EBV antikor seviyeleri yüksektir. Organlarda EBV pozitif hücreler izlenir. Ateş, lenfadenopati ve hepatosplenomegali eşlik eder. CAEBV-B tipinde immün sistem, EBV enfekte B lenfositler üzerinde kontrolü sağlayamadığı için B hücrelerinin progresif kaybı ve hipogamaglobulinemi söz konusudur (19). CAEBV-T tipinde, T ve NK hücreleri enfektedir, EBV'ye özgü sitotoksik T hücre yanıtı bozulmuştur (18). CAEBV poliklonal, oligoklonal ve monoklonal olabilir (18). Klonallik prognostik önem taşır. Monoklonal vakaları EBV pozitif T hücreli lenfomadan ayırmak zor olabilir, bazı yazarlar monoklonal EBV pozitif T hücreleri içeren CAEBV vakalarını lenfoma olarak sınıflamak gerektiğini savunmaktadır (20,21). Morfolojik olarak dokularda T baskın, T ve NK hücre infiltrasyonu izlenir. Etkilenen dokuda yapısal çatı korunmuştur, EBV pozitif hücrelerde atipi izlenmez. İn situ hibridizasyon ile uniform görünümlü, sitotoksik T lenfositlerde pozitiflik izlenir. CAEBV-B hücre tipinin EBER boyanması akut enfeksiyöz mononükleozise benzerdir. Küçüklü büyüklü pozitif hücreler yanında çok sayıda negatif hücre de izlenir (17). Kronik aktif EBV sadece histomorfolojik bulgular ile verilebilecek bir tanı değildir. Klinik bilgilerin yanı sıra özellikle perifer kanında devam eden yüksek EBV viral yükünü bilmek çok önemlidir. Hidroa vacciniforma ve ağır sinek ısırığı alerjisi kronik aktif EBV subtiplerindendir, nadir görülürler (18).

4.B.2. EBV pozitif mukokütanöz ülser: İmmünsuprese hastalarda iyi sınırlı, ağrılı mukozal veya kütanöz ülserle karakterli bir B-lenfoproliferatif hastalıktır. İmmünsupresyon etiolojisinde yaş, ilaç kullanımı, transplantasyon yer alabilir. En sık orofarengeal mukozada yer alır. Yaşlı hastalarda veya immünsupresyonun ortadan kalktığı durumlarda spontane gerileyebilir. İmmünsupresif olduğu bilinen bir hastada, agresif bir tanı verip tedaviyi yanlış yönlendirmeden önce hastanın immünsupresyon durumu ile ilişkili olabilecek bu antitenin farkında olmak patologlar için ciddi önem arz etmektedir. Patogenezi net bilinmemektedir. T hücre fonksiyonlarında azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. T lenfositler virüsü sistemik olarak kontrol altında tutmayı başarsalar da lokal EBV-bağımlı proliferasyon gerçekleşebilmektedir. Morfolojide iyi sınırlı ülser, mikst enflamasyon, değişken sayıda CD30 pozitif hücre, EBER pozitif büyük immünoblastlar izlenir. Bazı immünoblastlar atipik görünebilir. Lezyon tabanı genellikle CD3 pozitif küçük lenfositlerle keskin sınırlanma gösterir. EBER in situ hibridizasyonda ülser yüzeyi komşuluğunda yoğunlaşma eğiliminde, ülser tabanından uzakta, yer yer dağınık büyük-küçük boyutlu EBV enfekte hücreler izlenir (17,18,22).

4.C. EBV İlişkili B Lenfoproliferatif Hastalıklara Yaklaşım

4.C.1. Hodgkin lenfoma: Hodgkin lenfomada fonksiyonel B hücre reseptörü taşımayan EBV pozitif germinal merkez B hücreleri, programlanmış hücre ölümünden kaçar. LMP1 ve LMP2A sağkalım sinyallerini taklit eder. LMP1, devamlı aktif CD40 reseptörü gibi davranırken LMP2A, B hücre reseptörünü taklit eder. Aynı zamanda LMP1, NFKB yolağı aktivasyonu üzerinden BCL2 proteininin ifadesinde artışa yol açarak antiapoptotik etki gösterir. NFKB yolağındaki aktivasyon aynı zamanda Hodgkin hücrelerinde proliferasyonu indükler (23,24). Özellikle lenfositten fakir (>%95) ve mikst selüler (%70) Hodgkin lenfoma tiplerinde EBV pozitifliğine daha sık rastlanır (18). Primer immün yetmezlik ve HIV zemininde gelişen Hodgkin lenfomaların tamamı EBV pozitiftir. Hodgkin tanısı için immünhistokimyasal olarak LMP1 ifadesini araştırmak tek başına yeterlidir (Latensi II). İn situ hibridizasyon (ISH) ile EBER Hodgkin Reed Sternberg hücrelerinde pozitiftir (Resim 1).

4.C.2. Burkitt lenfoma: Özellikle endemik vakalar kuvvetli EBV ilişkisi göstermektedir. Burkitt'in asıl patogenezinde MYC translokasyonu yer almakla birlikte EBV ilişkili vakalarda genlerdeki kırılma noktalarının farklı olduğu gösterilmiştir (25). Patogenezde EBV'nin rolü net aydınlatılamasa da malignite gelişimini indükleyen bir faktör olduğu düşünülmektedir (3,18,26) (Resim 2).

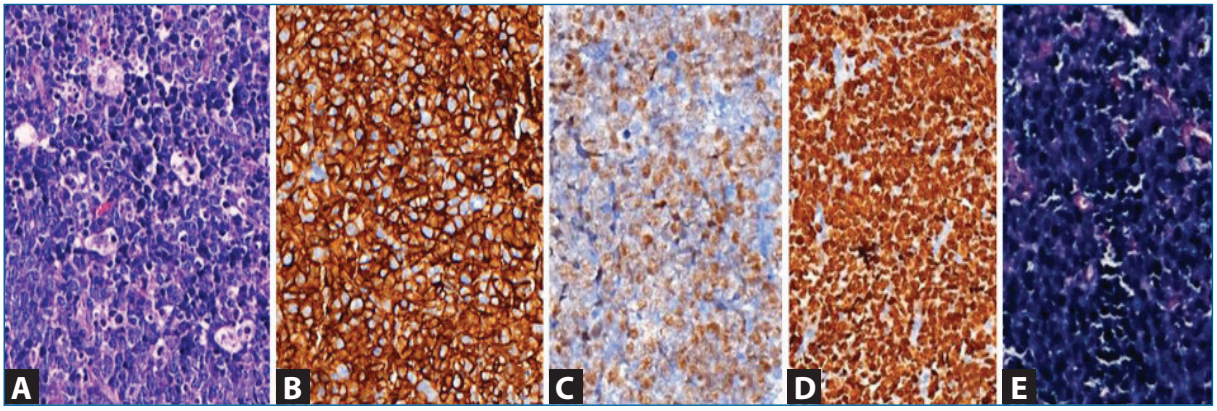
4.D. EBV İlişkili NK/T Hücreli Lenfoproliferatif Hastalıklara Yaklaşım

EBV ilişkili NK/T hücreli lenfomalarda tanı aşamasında T ve NK hücre belirteçlerinin yanı sıra, T hücreleri için klonalite ve EBER in situ hibridizasyon analizleri yapılmaktadır (27). NK/T hücreli lenfomalarda, perifer kanında EBV-DNA yükü prognostik önem taşıdığı gibi hastalık yükü ile ilgili bilgi de verebilir (Resim 3) (28).

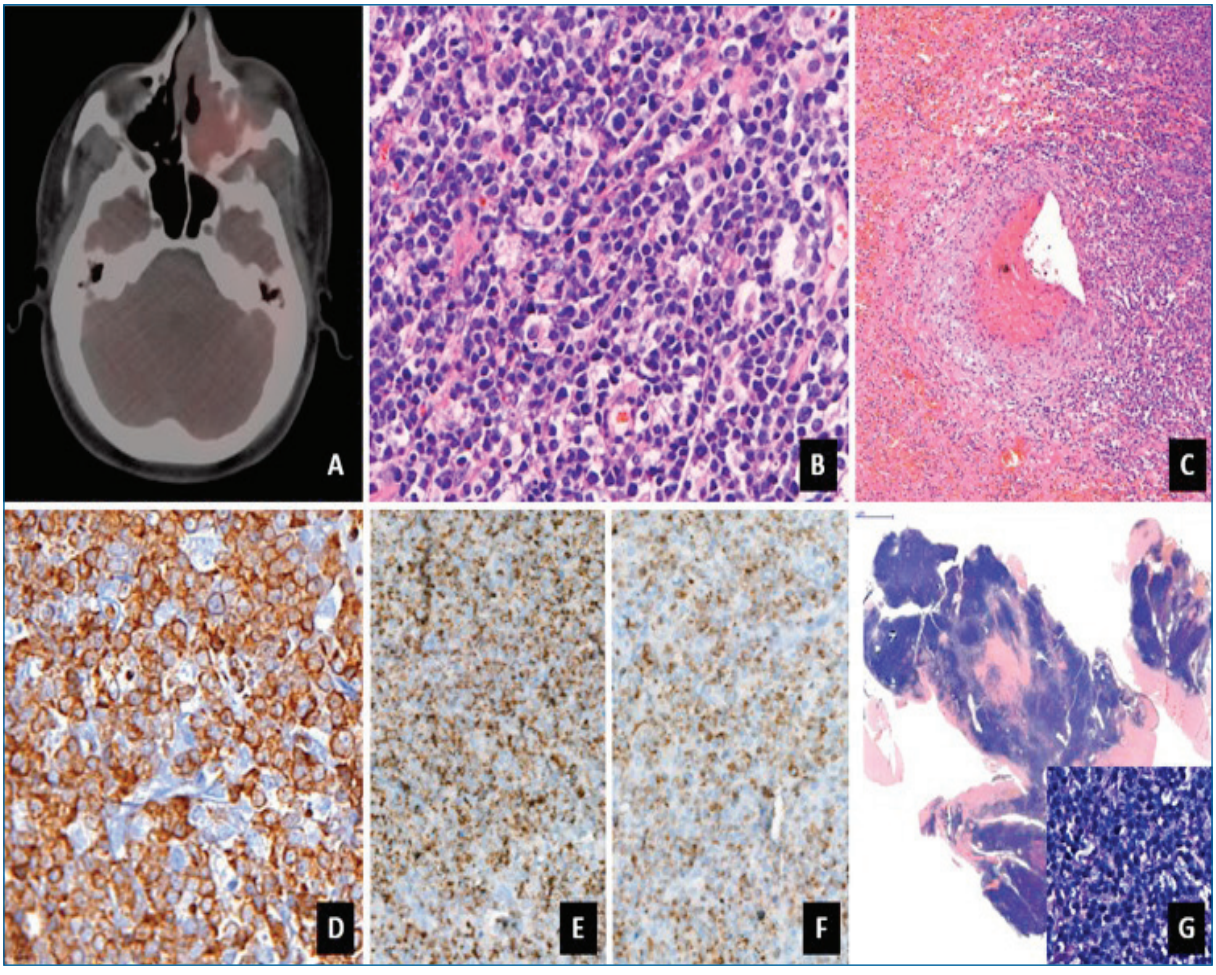
4.F. EBV İlişkili Epitelyal Lezyonlara Yaklaşım

4.F.1. Andiferansiye nazofarengeal karsinoma: EBV pozitifliği %75-%100 oranlarında izlenir. Latensi II ilişkili olduğunu bildiren yayınlar bulunmakla birlikte, LMP1 bu kanserlerde spesifik değildir. Bu sebeple tanıda EBER in situ hibridizasyon kullanılır (Resim 4, Resim 5).

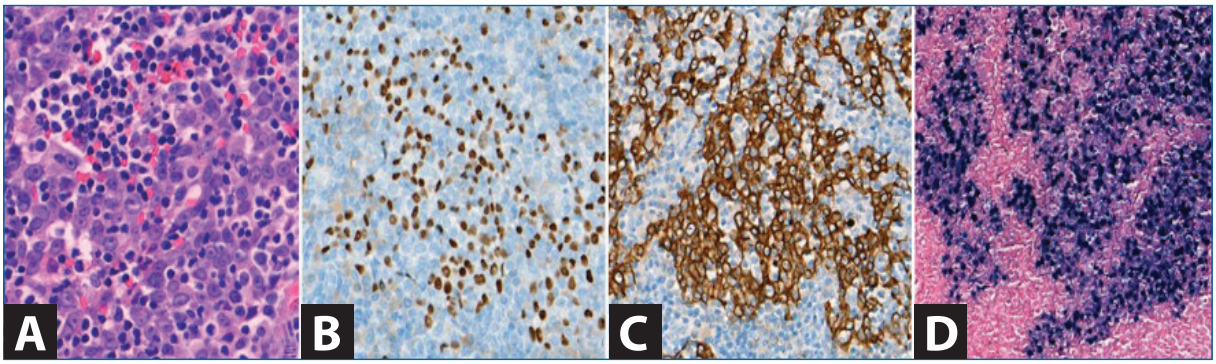
4.F.2. Mide karsinomu: Lenfoepitelyoma benzeri mide kanserlerinde %90, adenokarsinomlarda %5 ile %25 arası EBV pozitiflikleri bildirilmiştir. Gastrik epitele IgA aracılı endositozla girdiği düşünülmektedir. Kanser patogenezindeki rolü net aydınlatılmamakla birlikte kronik enflamasyonun yol açabileceği doku hasarı ve EBV ilişkili lezyonlarda gösterilmiş bazı genomik değişiklikler suçlanmaktadır (29).



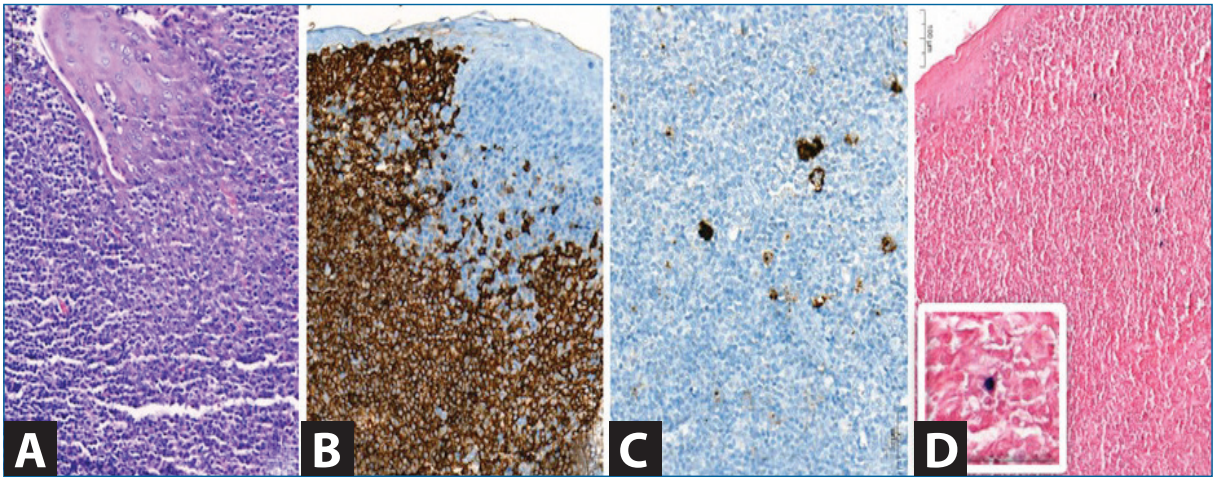
Resim 2. *Mide. Burkitt lenfoma.* ***A.*** *HE kesitte neoplastik hücreler ve arasında dağınık "tingible body" makrofajların oluşturduğu yıldızlı gökyüzü manzarası izlenmektedir.* ***B.*** *Neoplastik hücreler CD20 ile diffüz pozitif.* ***C.*** *MYC ile %80 civarında pozitif saptanmıştır.* ***D.*** *Ki67 proliferasyon indeksi %100'e yakın çok yüksek izlenmektedir.* ***E.*** *Neoplastik hücreler ISH ile diffüz EBER pozitifliği göstermektedir.*



Resim 3. *Ekstranodal NK/T hücreli lenfoma, nazal tip vakası.* ***A.*** *PET/BT'de sol maksiller sinüsü dolduran, sol orbital duvarı erode ederek, nazal kaviteye ve sol etmoid sinüse invazyon gösteren ekspansil kitle (SUVmaks: 35.8).* ***B.*** *Sinüs biyopsisinde pleomorfik, orta-büyük boyutlu, hiperkromatik yuvarlak-oval nükleuslu lenfoid infiltrasyon.* ***C.*** *Anjiyoinvazyon.* ***D.*** *İmmünhistokimya ile yaygın CD3 boyanan T lenfositler.* ***E.*** *Granzim immünhistokimyası* ***F.*** *Perforin immünhistokimyası.* ***G.*** *EBER ISH.*



Resim 4. *Andiferansiye nazofarengeal karsinoma.* ***A.*** *HE kesitte belirgin nükleollü, yuvarlak-oval veziküler nükleuslu, geniş eozinofilik sitoplazmalı atipik hücreler ve bu hücreler ile karışık lenfoid hücreler izlenmektedir.* ***B.*** *Tümör p40 ve* ***C.*** *PANCK pozitiftir.* ***D.*** *EBER ISH ile tümör yaygın EBV pozitiftir.*



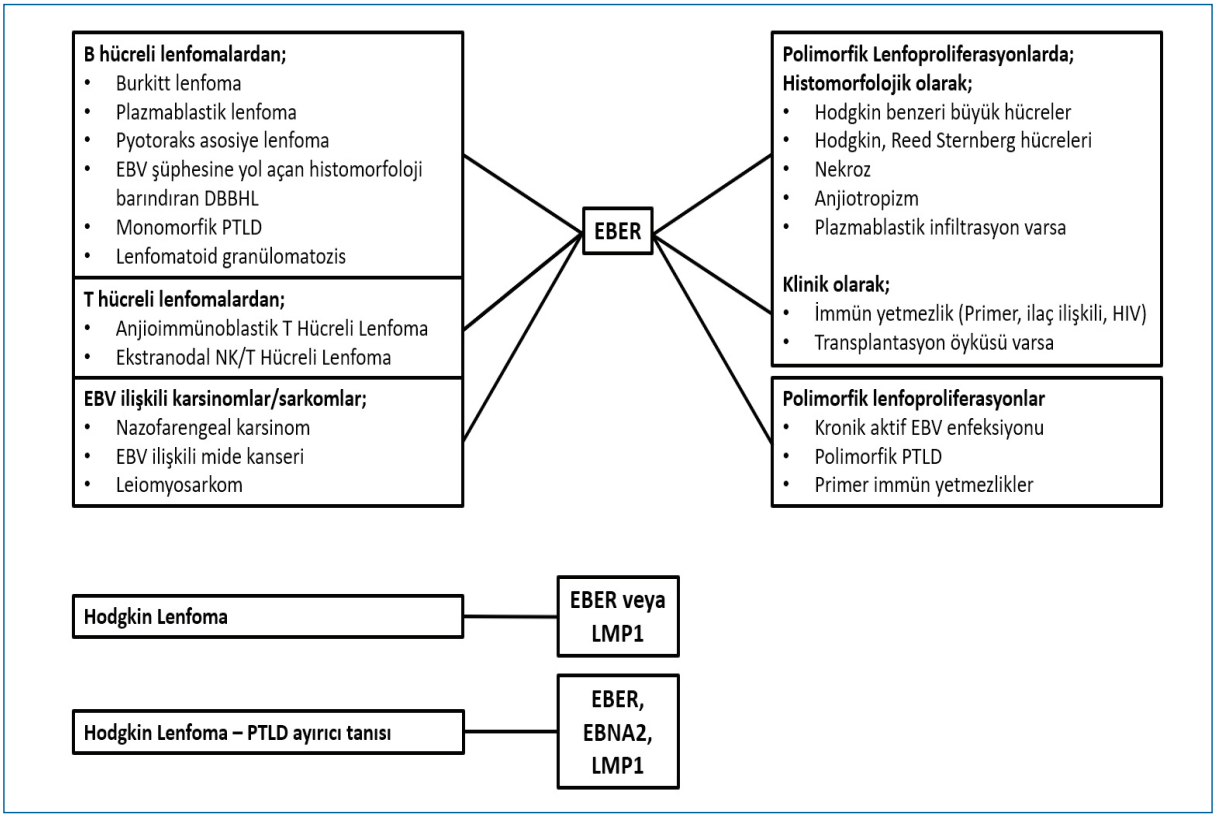
Resim 5. *Nazofarengeal reaktif lenfoid hiperplazi.* ***A.*** *Nazofarenkse ait örneklerde çok katlı yassı epitel ve mukoza altında yoğun lenfoid doku dikkati çekmektedir.* ***B.*** *CD20 pozitif bol miktarda küçük boyutlu B lenfositler izlenmektedir.* ***C.*** *CD30 ile dağınık az sayıda pozitif hücre mevcuttur.* ***D.*** *Lenf nodülü veya nazofarengeal lenfoid hiperplazilerde EBER ISH ile çok seyrek tek tük latent EBV pozitif hücre bulunabilir.*

SONUÇ

Bir patolog için dokuda EBV varlığını araştırıp araştırmayacağına karar vermek, histomorfolojik özellikleri ve klinik bilgiyi birlikte değerlendirmesine dayanmalıdır. İmmünkompetan hastada, lenfoid dokularda EBV şüphesi temel olarak histomorfolojik özelliklere göre oluşur ancak immünsuprese hastada histolojik olarak reaktif düşünülen durumlarda da EBV çalışılması faydalı olacaktır. Dokuda EBV varlığını göstermek için en duyarlı ve kesin yöntem EBER ISH'dir.

EBV ile ilişkisi bilinen lezyonlardan şüphelenildiğinde, dokuda EBV varlığının araştırılması tanısal yaklaşımda standart olmalıdır. Bu noktada patoloğun şüphelendiği antiteye uygun analizi yapması beklenir. Örneğin; Hodgkin lenfoma, latensi II pattern gösterdiği için immünhistokimyasal olarak EBV-LMP1 uygulamak yeterli olacaktır. Ancak EBV ilişkili diffüz büyük B hücreli lenfomalarda EBV-LMP1 negatiftir, EBER ISH çalışılmalıdır. Örneğin; düşük dereceli B hücreli lenfomalarda neredeyse hiç EBV ilişkisi beklenmez, bu sebeple EBV araştırılması önerilmez. Vaka özelinde, uygun immünhistokimyasal ve moleküler test seçimi tablo 2'de özetlenmiştir (Tablo 2).

Klinik olarak ise patoloji tanısına yardımcı yöntemler, seroloji ve perifer kanında viral yük değerlendirmesidir. Perifer kanında EBV viral yükünün araştırılması, EBV ilişkili hastalıkların bir kısmının tanı ve takibinde önem taşımaktadır. Özellikle, PTLD'de tedavi yanıtı değerlendirme, Hodgkin lenfoma ve ekstranodal NK/T hücreli lenfomalarda prognostik değerlendirme ve tedavi yanıtı değerlendirmesi, kronik aktif EBV enfeksiyonunda ise tanı ve prognostik değerlendirmede kullanılmaktadır. EBV'ye karşı gelişen antikorların (VCA-IgM, VCA-IgG, EA-IgG, EBNA-IgG) serolojik tespiti ise aktif enfeksiyon tanısı için özellikle önemlidir. IgM akut enfeksiyon, IgG ise geçirilmiş enfeksiyonu gösterir. Ancak immün yetmezlik tanılı hastalarda antikorların negatifleşebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle kanda EBV sonuçları yorumlanırken antikorların yanı sıra EBV viral yükü de araştırılmalıdır (28).



Tablo 2. Dokuda EBV araştırırken hangi vakada hangi testi yapalım?

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. Lancet 1964;1(7335):702-3. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-72.
2. Henle W, Henle G. Seroepidemiology of the virus. The Epstein-Barr Virus: Springer 1979. p. 61-78. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67236-1_4
3. Münz C. Epstein barr virus volume 1: One herpes virus: Many diseases. Current Topics in Microbiology and Immunology. Switzerland: Springer 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8
4. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. Clin Cancer Res 2004;10(3):803-21. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0670-3
5. Kempkes B, Robertson ES. Epstein-Barr virus latency: Current and future perspectives. Curr Opin Virol 2015;14:138-44. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007
6. Rickinson AB. Co-infections, inflammation and oncogenesis: Future directions for EBV research. Semin Cancer Biol 2014;26:99-115. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.004
7. Tao Q, Young LS, Woodman CB, Murray PG. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers-genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. Front Biosci 2006;11:2672-713. https://doi.org/10.2741/2000
8. Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD, et al. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBP-Jk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. Mol Cell Biol 1996;16(3):952-9. https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.952
9. Gires O, Zimber-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. EMBO J 1997;16(20):6131-40. https://doi.org/10.1093/emboj/16.20.6131
10. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK, et al. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: An update. Front Oncol 2018;8:211. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211
11. Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. Science 1967;157(3792):1064-5. https://doi.org/10.1126/science.157.3792.1064
12. Tomkinson B, Robertson E, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. J Virol 1993;67(4):2014-25. https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.2014-2025.1993
13. Swaminathan S, Tomkinson B, Kieff E. Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88(4):1546-50. https://doi.org/10.1073/pnas.88.4.1546

14. Pope JH, Horne M, Scott W. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. Int J Cancer 1968;3(6):857-66. https://doi.org/10.1002/ijc.2910030619
15. Kikuchi K, Inoue H, Miyazaki Y, Ide F, Kojima M, Kusama K, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-associated epithelial and non-epithelial lesions of the oral cavity. Jpn Dent Sci Rev 2017;53(3):95-109. https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.01.002
16. Price AM, Luftig MA. To be or not IIb: A multi-step process for Epstein-Barr virus latency establishment and consequences for B cell tumorigenesis. PLoS Pathogens 2015;11(3):e1004656. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004656
17. Rezk SA, Zhao X, Weiss LM. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoid proliferations, a 2018 update. Hum Pathol 2018;79:18-41. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.020
18. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th ed). Lyon: IARC 2017.
19. Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK, Pittaluga S, Heslop HE, Rooney CM, et al. Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: A 28-year experience in the United States. Blood 2011;117(22):5835-49. https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316745
20. Ohshima K, Kimura H, Yoshino T, Kim CW, Ko YH, Lee SS, et al. Proposed categorization of pathological states of EBV-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder (LPD) in children and young adults: Overlap with chronic active EBV infection and infantile fulminant EBV T-LPD. Pathol Int 2008;58(4):209-17. https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2008.02213.x
21. Fujiwara S, Nakamura H. Chronic active Epstein-Barr virus infection: Is it immunodeficiency, malignancy, or both? Cancers 2020;12(11):3202. https://doi.org/10.3390/cancers12113202
22. Ikeda T, Gion Y, Yoshino T, Sato Y. A review of EBV-positive mucocutaneous ulcers focusing on clinical and pathological aspects. J Clin Exp Hematop 2019;59(2):64-71. https://doi.org/10.3960/jslrt.18039
23. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, Spieker T, Diehl V, Wolf J, et al. Clonal deleterious mutations in the IκBα gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. J Exp Med 2000;191(2):395-402. https://doi.org/10.1084/jem.191.2.395
24. Murray PG, Young LS. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. Blood 2019;134(7):591-6. https://doi.org/10.1182/blood.2019000568
25. Allday MJ. How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? Semin Cancer Biol 2009;19(6):366-76. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.07.007
26. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 2004;4(10):757-68. https://doi.org/10.1038/nrc1452
27. Hue SS, Oon ML, Wang S, Tan SY, Ng SB. Epstein-Barr virus-associated T- and NK-cell lymphoproliferative diseases: An update and diagnostic approach. Pathology 2020;52(1):111-27. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.011
28. Kimura H, Kwong YL. EBV viral loads in diagnosis, monitoring, and response assessment. Front Oncol 2019;9:62. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00062
29. Morales-Sanchez A, Fuentes-Panana EM. Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and potential mechanisms of oncogenesis. Curr Cancer Drug Targets 2017;17(6):534-54. https://doi.org/10.2174/1568009616666160926124923