

# Laboratoriumdiagnostiek van Epstein-Barr-virusinfecties

A.C.M. Kroes

**Infecties door Epstein-Barr-virus (EBV) kunnen worden aangetoond door detectie van het virus en door het vaststellen van virus-specifieke antistoffen. De antistofdetectie is de meest praktische benadering en is in staat nauwkeurige informatie te verschaffen over het infectiestadium door het onderscheiden van de respons tegen verschillende virale antigenen. De klassieke patronen die dit oplevert in stadia van acute, recente, chronisch-actieve en latente infecties, zijn gebaseerd op immunofluorescentietechnieken uitgevoerd op EBV-positieve cellijnen. Recent is het door het gebruik van hooggezuiverde, recombinant of synthetische virale antigenen in ELISA's eveneens mogelijk gebleken het infectiebeloop nauwkeurig te vervolgen. De patronen die deze bepalingen opleveren, zijn niet noodzakelijk precies overeenkomstig aan die van immunofluorescentiemethoden. De nieuwe technieken maken het wel mogelijk om op EBV-specifieke serologie breder toe te passen. Het gebruik van heterofiele antistofdetectie in de diagnostiek van EBV-infecties vereist een duidelijk inzicht in de aanzienlijke beperkingen van deze klassieke techniek. Deze serologische respons is niet virusspecifiek en de gevoeligheid is sterk leeftijdsafhankelijk.**

**Trefwoorden:** Epstein-Barr-virus, mononucleosis infectiosa, immunofluorescentie, ELISA, heterofiele antistoffen, Paul-Bunnell-test.

Epstein-Barr-virus (EBV) heeft een wonderlijke historie die begon toen het als een nieuw virus in de familie van humane herpesvirussen werd geassocieerd met een bijzondere, eigenlijk exotische tumor: een endemisch voorkomend lymfoom, vooral van de kaak, bij jonge kinderen in Centraal-Afrika. De Britse chirurg Denis Burkitt beschreef de tumor in 1958<sup>1</sup> en hij wekte de interesse van de patholoog Anthony Epstein, die in 1964 na voorafgaande weefselkweek met elektronenmicroscopie herpesvirus-partikels in de tumorcellen aantrof. Na diens beschrijving kreeg het virus de naam van Epstein en tevens van de hierbij betrokken studente Yvonne Barr.<sup>2</sup>

De beschikbaarheid van viraal antigeen in cellijnen afkomstig van deze B-celtumor maakte het mogelijk, met de toen juist beschikbaar gekomen immunofluorescentietechniek, het voorkomen van antistoffen bij de bevolking na te gaan. Uiteraard werden deze antistoffen aangetroffen bij de patiënten met het Burkitt-lymfoom in Afrika, doch het was zeer verrassend vast te stellen dat een ruime meerderheid van de bevolking in westerse landen ook antistoffen bezat tegen dit virus. EBV bleek een verspreiding te hebben die niet paste bij een zeldzame exotische tumor.<sup>3</sup>

Pionierswerk op dit gebied werd vooral verricht door het echtpaar Werner en Gertrude Henle in Philadelphia. Zij perfectioneerden de immunofluorescentietechniek en beschreven nauwkeurig de antistofpatronen die waarneembaar waren bij geïnfecteerden. Vooral van belang is dat zij daarbij de belangrijkste ziekte-associatie van EBV in westerse landen aan het licht brachten.<sup>4</sup> Het klassieke verhaal is dat een vrij zeldzame negatieve controlepersoon, een analiste op hun laboratorium, na een ziekteverlof weer terugkeerde en toen antistoffen bleek te bezitten

tegen EBV. Slechts het simpel navragen van de aard van de ziekte was toen voldoende. Zij had een 'mono' door-gemaakt: in Amerika de aanduiding voor de frequente aandoening van adolescenten, vollediger mononucleosis infectiosa genoemd (de term ziekte van Pfeiffer is internationaal vrijwel onbekend). Dit speelde zich af in 1968, juist toen de discussies hoog opliepen over wat de aard kon zijn van de nog zeer mysterieuze verwekker van deze steeds frequenter voorkomende ziekte. Alle vervolgens door hen onderzochte gevallen bleken de bewuste sero-conversie te vertonen in het ziektebeloop. Een Afrikaans tumorvirus veroorzaakt dus een frequente infectieziekte onder adolescenten in westerse landen, vooral in beschermde milieus waarin men het virus pas na de kinderleeftijd ontmoet.

De betekenis van het werk van de 'Henles' is zeer groot geweest. Zij brachten de serologische respons van de EBV-infectie in kaart met veel aandacht voor detail. Al snel werd hun benadering de gouden standaard voor EBV-diagnostiek en in feite is zij dat nog steeds. De zorgvuldig uitgevoerde immunofluorescentieserologie op goed gekarakteriseerde EBV-positieve cellijnen van verschillende aard, levert veel informatie op over de fase van de infectie door correlatie met de expressie van verschillende virale antigenen. Pas recent, ongeveer dertig jaar later, is er met moleculair-biologische technieken zoveel vooruitgang geboekt in de analyse van specifieke virale antigenen, dat wij voorzichtig kunnen stellen dat het 'post-Henliaanse' tijdperk is aangebroken. Iedere nieuwe benadering van de EBV-serologie wordt echter nog steeds getoetst aan hun klassieke opvattingen en er bestaat dan ook een sterke neiging deze inmiddels vertrouwde patronen als standaard aan te houden. In de praktijk zijn er echter meer mogelijkheden ontstaan voor

uitvoeren van EBV-serologie, die hierna zullen worden besproken.

### Overzicht van EBV-diagnostiek

In tabel 1 zijn de mogelijke benaderingen in de EBV-diagnostiek samengevat. Niet alleen in de microbiologie is het vaststellen van EBV-infecties aan de orde; in de pathologie is het detecteren van EBV in tumoren van het lymfoïde systeem ook van belang. De daarbij toegepaste technieken, vooral in situ detectie van viraal antigeen, RNA en DNA worden hier niet besproken.

Belangrijk is het onderscheid tussen virusdetectie en serologie. Virusdetectie is bij EBV van beperkt diagnostisch belang. Om primaire infecties op te sporen, is virusdetectie moeilijk bruikbaar omdat het virus nadien levenslang persisteert; als een latente infectie in B-lymfocyten maar meestal met een actieve virusuitscheiding in speeksel. Deze eigenschap is van groot belang voor de verbreiding van het virus. Infectie met EBV wordt zelden of nooit opgedaan van een persoon die juist zelf een symptomatische infectie doormaakt. In tegenstelling tot de naam imponeert mononucleosis infectiosa daardoor niet als een besmettelijke ziekte, en epidemieën van deze aandoening komen dan ook nooit voor. Het virus wordt namelijk voortdurend verspreid door verder gezonde virusdragers in de bevolking.

Er komen gevallen voor waarin virusdetectie wel nuttig kan zijn. Uiteraard indien nader onderzoek van het virus is vereist, bijvoorbeeld om door middel van analyse van virale heterogeniteit een infectiebron te kunnen vaststellen.<sup>5,6</sup> Vroege virusdetectie bij gastheren met een verminderde immuniteit, vooral na beenmergtransplantatie, vereist ook dat het virus zelf wordt opgespoord.<sup>7</sup> In die situatie is een antistofrespons immers niet te verwachten. Ook lymfomen in het centraal zenuwstelsel bij AIDS-patiënten kunnen snel en gevoelig worden opgespoord met liquordetectie van EBV-DNA.<sup>8</sup> Behalve in deze bijzondere gevallen vindt de diagnostiek van EBV-infecties plaats door middel van serologisch onderzoek. Zoals al beschreven, is uit het patroon van een combinatie van EBV-antistoffen veel informatie af te leiden: met name of een persoon geïnfecteerd is met het virus en bovendien of er sprake is van een recente primaire infectie, een infectie uitsluitend in een latente fase of een infectie die chronisch actief is. Een uniek fenomeen bij EBV-infecties is dat het serologisch onderzoek zich niet beperkt tot virus-specifieke antistoffen maar dat er als speciale marker voor een recente primaire infectie gebruik gemaakt kan worden van antistoffen die niet tegen het virus zijn gericht. Dit betreft de zogenaamde heterofiele antistoffen, een respons

die als epifenomeen door de infectie blijkt te worden uitgelokt. Op de nadere plaatsbepaling van deze diagnostiek wordt ingegaan.

### Technieken voor virusdetectie

Virusdetectie kan plaatsvinden door middel van kweek of door het specifiek detecteren van viraal DNA. Voor viruskweek van EBV is de klassieke benadering patiëntmateriaal te incuberen met donorlymfocyten van een EBV-negatieve persoon. Hiervoor worden om praktische redenen vaak navelstrenglymfocyten gebruikt. Indien EBV aanwezig is in het materiaal (dat kan speeksel, keelspoelsel of perifere bloed betreffen) zal infectie van de donor B-cellen optreden die leidt tot de uitgroei van een EBV-positieve lymfoblastoïde cellijn (LCL). Een alternatieve benadering is lymfocyten uit perifere bloed of een orgaanbiopt van de patiënt te kweken in aanwezigheid van cyclosporine A; hierdoor wordt de ontwikkeling van cytotoxische T-cellen geblokkeerd en kan een aanwezigheid van endogeen EBV-getransformeerde B-cel lijn direct uitgroeien. Deze bepaling kan, vooral bij immunogestoorde patiënten, een indruk geven van de activiteit van de EBV-infectie.<sup>7</sup> Viruskweek van EBV is een bewerkelijke en langdurige techniek en speelt geen rol in routinematige diagnostiek van EBV-infecties. De gevoeligheid is lager dan die van viraal DNA-detectie. Deze techniek is echter van groot belang om EBV kwalitatief te analyseren.

EBV-DNA-detectie is door PCR eenvoudig uitvoerbaar en zeer gevoelig, bijvoorbeeld op perifere leukocyten. Deze techniek kan een rol spelen om EBV zo vroeg mogelijk op te sporen bij patiënten 'at risk': EBV-negatieve beenmerg- en orgaanontvangers. De gevoeligheid blijkt uit het feit dat EBV op deze wijze bij bijna alle EBV-seropositieve personen in keel en bloed aantoonbaar is. Dit levert ook een beperking op: EBV-DNA-detectie vereist eigenlijk een kwantitatieve uitvoering om het niveau van activiteit vast te stellen en het beloop te vervolgen.<sup>9</sup>

### De virus-specifieke immuunrespons

Om het diagnostisch gebruik van de antistofrespons goed te kunnen begrijpen, is het van belang de pathogenese van de EBV-infectie nader toe te lichten. EBV infecteert B-lymfocyten en in deze cellen vindt vervolgens virusreplicatie plaats met expressie van alle daarvoor noodzakelijke structurele en niet-structurele eiwitten. Deze antigenen leiden tot een cellulair en humorale immuunrespons. Omdat deze actieve virusreplicatie leidt tot celdood, wordt dit aangeduid als de lytische infectiecyclus van het virus. Onder invloed van de immuunrespons vindt echter een verschuiving plaats naar een tweede vorm waarin EBV zich in een B-lymfocyt kan bevinden. Daarbij vindt er geen actieve virusreplicatie plaats en is er minder expressie van, overigens andere, virale antigenen. Dit betreft de fase van de latente infectie. Er is wel sprake van replicatie maar op een bijzondere wijze: de virusinfectie leidt tot klonale proliferatie van de B-cel en het viraal DNA replicateert daarbij passief, door middel van cellulair DNA-polymerase.

Dit proces is duidelijk een bedreiging voor de gastheer en zonder een adequate cellulair immuunrespons kan een EBV-infectie leiden tot fatale lymfomen, zoals blijkt bij bepaalde erfelijke immuundeficiënties (X-linked lym-

Tabel 1. Diagnostiek van Epstein-Barr-virusinfecties.

1. Virusdetectie
• viruskweek (speeksel, perifere bloed)
• EBV-DNA detectie door middel van PCR (speeksel, perifere bloed, liquor, lymfoomcellen)
2. Antistofdetectie
• EBV-specifieke antistoffen tegen verschillende virale antigenen, IgG/IgM/IgA (immunofluorescentie, ELISA)
• heterofiele antistoffen (agglutinatie testen)

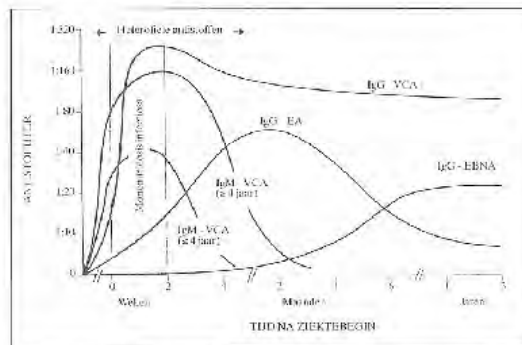
phoproliferative disease) en soms ook bij transplantatiepatiënten. De persisterende infectie van B-cellen leidt tot een sterke cellulaire respons die de klonale B-cel-expansie vervolgens beheerst en tot een zeer laag niveau terugbrengt.<sup>10</sup> Het is inmiddels ook duidelijk dat de klinische verschijnselen die de primaire infectie met zich mee kan brengen volledig voortkomen uit deze actieve cellulaire immunrespons: T-celproliferatie is zeer opvallend in deze fase in zowel het perifere bloed als in alle lymfoïde organen, zoals lymfklieren, vooral in en rondom de keel en in de mil. Opmerkelijk is dat de ontwikkeling van deze respons het meest heftig verloopt na de kinderleeftijd: de symptomatische primaire infectie is daardoor zeldzaam op jongere leeftijd. Ook duurt het vrij lang, tot ongeveer zes weken na het tijdstip van de infectie, voordat deze respons tot ontwikkeling komt.

Voor de serologische diagnostiek zijn twee zaken van belang. Ten eerste: antigenen die bij de virusrepletie in de lytische cyclus een rol spelen, leiden tot een sterke antistofrespons bij de primaire infectie, zowel van IgG- als IgM-klasse. De belangrijkste antigenen die door immunofluorescentie zijn gekarakteriseerd, worden aangeduid als viral capsid antigen (VCA) en early antigen (EA). In feite zijn dit echter complexen van vele verschillende virale eiwitten. De IgM-respons verdwijnt na de primaire infectiefase, de IgG-respons persisteert op een wisselend niveau waarbij vooral de VCA-component goed aantoonbaar blijft met de klassieke immunofluorescentietechnieken. De anti-EA-IgG-respons is door zijn lagere intensiteit vooral gecorreleerd met fasen van zeer actieve virusrepletie. Het voorkomen van IgA-antistoffen tegen VCA en EA is ongebruikelijk, behalve bij het EBV gerelateerde nasofarynxcarcinoom, waar deze antistoffen als een gevoelige tumormarker kunnen fungeren.

Ten tweede: antigenen die in de latente infectiefase tot expressie komen, leiden tot een antistofrespons later in het beloop van de primaire infectie en persisteren daarna levenslang. Dit betreft vooral de respons tegen de zogenaamde kernantigenen, typerend voor deze infectiefase (EBNA, Epstein-Barr-virus nuclear antigens). Anti-EBNA is derhalve afwezig in de eerste fase van een primaire infectie, althans wederom bij gebruik van de klassieke technieken. Ook neigt deze respons tot een luterdaling als er door vermindering van de specifieke immuniteit meer virus in een lytische infectiefase komt.

Een belangrijk fenomeen moet nog worden vermeld: de beschreven immunresponsen zijn in hun beloop inderdaad goed te correleren met de fasen van de primaire infectie en de overgang naar een laag niveau van latente infectie. Doch de klinische verschijnselen van de primaire infectie correleren minder duidelijk. Dit is te begrijpen als wordt bedacht dat de pathogenese hiervan een ander effectormechanisme heeft, namelijk een specifieke cellulaire reactie. Dat de 'timing' van deze respons enigszins varieert ten opzichte van de antistofpatronen was ook de 'Henles' al opgevallen.<sup>11</sup> Specifieke immunosuppressie kan tot nog sterkere afwijkingen leiden in dit opzicht.<sup>12</sup> Voor de praktijk betekent dit: de typische mononucleosis infectiosa kan zich voordoen vóór, tijdens of na de antistofpieken die typerend zijn voor de primaire infectie. Correlatie van het antistofpatroon met het klinisch herstel is zeer beperkt: slechts in zeldzame gevallen kan men

op die wijze vaststellen dat de overgang naar een latente infectiefase niet plaatsvindt. Het gebruikelijke titerbeloop van de antistoffen is weergegeven in figuur 1. Hierbij is, zoals al vaker vermeld, gebruik gemaakt van antistofdetectie door middel van met immunofluorescentie gekarakteriseerde antigenen.



Figuur 1. Klassiek schema van het titerbeloop van verschillende antistoffen tegen EBV-antigenen zoals vastgesteld door middel van immunofluorescentie op EBV-positieve cellijnen. Aangeduid is tevens een minder heftige serologische respons bij jonge kinderen. Deze patronen zijn niet zonder meer te reproduceren door middel van ELISA's die gebruik maken van geïsoleerde virale antigenen.

#### Nieuwe ontwikkelingen in de serologie

Van alle humane virussen hoort EBV tot de best onderzochte in moleculair-biologisch opzicht. De nucleotidesequentie van het 172-kbase grote genoom is al sinds lang bekend<sup>13</sup> en open reading frames voor vele belangrijke virale eiwitten zijn daarin herkend. Daardoor is het mogelijk geworden om specifieke virale antigenen met recombinant DNA-technieken tot expressie te brengen en te benutten voor serologische diagnostiek. Dit maakt het tevens mogelijk om als techniek hiervoor het effectieve ELISA-principe te gebruiken, waar met een hoge gevoeligheid snelle en objectieve aflezing mogelijk is, in tegenstelling tot de meer hewerkelijke immunofluorescentie. De afgelopen jaren heeft deze benadering inderdaad een praktische betekenis kunnen krijgen. Toch is de introductie daarvan in de praktijk niet gemakkelijk geweest: de mate waarin met gezuiverde, recombinant of synthetische antigenen de klassieke respons van immunofluorescentie-aflezing gereproduceerd kon worden, bleek nog wel eens tegen te vallen. Dit vereiste dan een zekere aanpassing ten opzichte van de hierboven beschreven interpretaties, soms zelfs een volledig ander interpretatieschema.<sup>14</sup> Enerzijds is dit te verklaren door het feit dat de antigenen die gebruikt worden in de immunofluorescentietechniek niet uit enkelvoudige virale eiwitten bestaan. Ook is het van belang dat deze techniek een eigen redelijk constante gevoeligheid heeft die bij op ELISA gebaseerde systemen sterk kan afwijken. Het tijdsbeloop van de curves kan dan aanmerkelijk anders worden.

Met de genoemde beperkingen voor ogen is het belangrijk een nieuw diagnostisch systeem voor EBV-infecties op een bepaalde wijze te ijken, door de responsen tegen de verschillende antigenen in het infectiebeloop na te gaan. Een belangrijk principe blijft daarbij dus wel dat er voor maximale informatie uitgegaan wordt van meerdere antigenen, zoals ook in de klassieke benadering, tennin-

ste één uit de lytische infectiefase en één uit de latente fase.

Het is gebleken dat moderne ELISA-alternatieven goed kunnen fungeren in de serologische diagnostiek van EBV-infecties, als de interpretatie van de resultaten gebaseerd is op kennis van het beloop van de infectie. Een aantal fabrikanten brengt momenteel bruikbare systemen op de markt.<sup>15</sup> Voor het lytische cyclusanatigeen wordt daarbij gebruikt gemaakt van VCA-achtige antigenen, bijvoorbeeld gezuiverd gp125 (Gull), synthetisch VCA-p18-peptide (Organon Teknika, Sorin, Inestar), een EA-achtig recombinant antigeen (Biostat) of een synthetisch peptide gebaseerd op het 'ZEBRA'-eiwit dat de lytische cyclus activeert (Gull, experimenteel).

IgG- en IgM-detectie gebaseerd op deze antigenen kan fungeren om inzicht te krijgen in het infectiebeloop, globaal zoals bij immunofluorescentie. Ook voor EBNA-1 zijn recombinant antigenen in ELISA's toegepast. De responsen tegen deze zuivere antigenen en vooral de gevoeligheid waarmee die bepaald worden, kunnen echter in het algemeen tot afwijkingen leiden van de klassieke patronen en in individuele gevallen soms nog meer. Met immunofluorescentie wordt met 'VCA' als antigeen in feite een gemengde respons tegen vele epitopen van verschillende virale eiwitten vastgesteld met een gemiddelde gevoeligheid, bij ELISA's wordt met hoge gevoeligheid antistof gedetecteerd tegen een enkel goed gekarakteriseerd antigeen. Hierbij wordt dus niet bedoeld op de ook op de markt aanwezige ELISA's die gebruik maken van een niet gekarakteriseerd mengsel van verschillende EBV-antigenen: de diagnostische toepassingen daarvan zijn beperkt.

Een goed voorbeeld van de werkwijze, nodig om een EBV-antigeen te kunnen toepassen, is het onderzoek dat is verricht door van Grunsven et al. in de afgelopen jaren bij Organon Teknika.<sup>16</sup> Uiteindelijk is daarbij een belangrijk antigeen, het VCA-p18-combipeptide, bruikbaar gebleken, doch de respons is niet volledig vergelijkbaar met de klassieke anti-VCA-respons in immunofluorescentie op een EBV-positieve cellijn. Een van de afwijkingen die in de praktijk opvalt, is de hoge gevoeligheid die kan leiden tot het detecteren van IgM in andere situaties dan die van een primaire infectie. Dit is hoogst ongebruikelijk in de klassieke schema's en daardoor diagnostisch potentieel verwarrend; vooral als het optreedt als secundair verschijnsel (reactivatie) bij een geheel andere infectie. Men zal zich in een diagnostische strategie daartegen moeten wapenen door in bepaalde situaties additionele testen te doen; bijvoorbeeld door een anti-EBNA-bepaling toe te voegen (negatief bij vroege primaire infecties, althans indien niet te hoog gevoelig gemaakt).

#### Heterofiele antistoffen

Vooraf aan het zojuist beschreven fenomeen is goed te zien dat EBV-infectie niet alleen leidt tot een reactie van het immuunsysteem, maar dat deze infectie zich ook afspeelt binnen het immuunsysteem, namelijk in het B-celcompartiment. Dit is waarschijnlijk de verklaring voor de opmerkelijke functionele aberratie die zich manifesteert als de heterofiele antistofrespons. Dit betreft namelijk een zeer sterke antistofrespons, vooral van de IgM-klasse, die ontstaat tijdens een primaire EBV-infectie, gericht tegen bepaalde dierlijke erythrocyten-antigenen. Deze anti-

stoffen leiden daardoor tot spontane hemagglutinatie van geschikte erythrocyten, zoals in 1932 al werd vastgesteld door Paul en Bunnell.<sup>17</sup> De antistoffen lijken niet gericht tegen enig viraal antigeen en hun voorkomen kan enigszins dissociëren met de antivirale antistofrespons. Ook is het fenomeen niet obligaat aanwezig, tot een leeftijd van 4 jaar is deze diagnostiek zeer laag sensitief, niet hoger dan 50 procent, daarna loopt de sensitiviteit geleidelijk op tot ongeveer 90 procent bij adolescenten.

Voordat het diagnostische gebruik wordt overwogen, is het interessant de oorsprong van dit fenomeen nader te bezien. De antigenen waartegen de respons is gericht, komen niet voor bij de menselijke gastheer maar tegen deze eenvoudige koolhydraatantigenen blijkt wel een respons te ontstaan, op een wijze die enige overeenkomst vertoont met die van de anti-A- en anti-B-antistoffen bij bloedgroep O-positieve personen. Bij een EBV-infectie treedt een sterke polyklonale stimulatie van het B-celsysteem op. Ook andere dan de heterofiele antistoffen kunnen worden aangetroffen op ongebruikelijke wijze. Uitgroei van specifieke B-celklonen die heterofiele antistoffen produceren, is dus wel een direct gevolg van de EBV-infectie, doch deze respons is niet tegen het virus gericht. Deze 'primitieve' respons tegen de soortvreemde erythrocytenantigenen kan echter indrukwekkende titerhoogten bereiken tijdens de primaire infectie, tot wel 1:100.000. In deze vorm is het fenomeen ook zeer specifiek voor een EBV-infectie. Lagere titers van dit soort antistoffen worden wel eens in andere gevallen aangetroffen. Omdat deze respons ook zeer eenvoudig en snel kan worden aangetoond, is te begrijpen dat de heterofiele antistofdiagnostiek een klassieker is in de laboratoriumpraktijk.<sup>18</sup>

Fichter, om verantwoord om te gaan met heterofiele antistofdiagnostiek zijn een aantal voorzorgsmaatregelen nodig die door hun aard dan helaas weer een beperking kunnen vormen voor het gemak en de snelheid van deze test. Dit betreft de *specificiteit*: een positieve agglutinatie-test (vaak 'slide test' genoemd) moet nader worden geconfirmeerd. Klassiek gebeurt dit door middel van de Paul-Bunnell-Davidsohn-test: een differentieële absorptie van antistoffen in combinatie met een titratie. Een ervaringsfeit is dat de met EBV geassocieerde heterofiele antistoffen niet of nauwelijks door een cavaniër-extract worden geabsorbeerd maar wel volledig door een lysaat van runder erythrocyten. Dit kan men voor de specificiteitscontrole benutten, doch overheersend is het belang van de titerhoogte. Hoge tot zeer hoge titers, die niet zeldzaam zijn, zijn vrijwel altijd specifiek voor EBV. Indien goed uitgevoerd, kan de specificiteit van de test hoog zijn, alleen de eenvoudige slide test heeft echter een matige specificiteit. Men dient verder op resttiters bedacht te zijn, al verdwijnt de respons vaak verrassend snel.

De *sensitiviteit* is sterk leeftijdsafhankelijk: de test kan daardoor niet gebruikt worden voor EBV-diagnostiek op de kindertijd en het liefst zou men deze bepaling in het geheel niet toepassen buiten de topleeftijd van symptomatische EBV-infecties (alleen dan is sprake van een redelijke sensitiviteit). Ook hier geldt dat een optimale technische uitvoering vereist is, zoals het toepassen van paardenerthrocyten, voor een aanvaardbare sensitiviteit. Heterofiele antistofdetectie kan nog een plaats hebben als vertrouwde snelle bevestiging van een klinische verdenking op primaire EBV-infectie, vooral in de eerstelijns-

Hierbij geldt dan de beperking dat een negatieve bevinding nadere analyse vereist, indien er werkelijk sprake is van een typisch mononucleosis-beeld. Klinisch niet of nauwelijks te onderscheiden zijn immers primaire EBV-, CMV-, HIV- en Toxoplasma-infecties. Het door enige vorm van laboratoriumonderzoek stellen van een causale diagnose bij dit beeld is een goede (huisarts)praktijk. In andere situaties is het beter direct te kiezen voor specifieke virusserologie. Gesteld moet worden dat het onjuist is te haarkloven over de hoogte van Paul-Bunnell-titers met en zonder cavaniër-extractabsorptie in een goed ontwikkeld laboratorium. Iedere twijfel is een reden voor EBV-specifieke serologie.

### Conclusie

De diagnostiek van EBV-infecties wordt beter uitvoerbaar door het gebruik van nieuwe systemen voor virus-specifieke serologie met goed gedefinieerde antigenen. Nog steeds is echter inzicht in de biologie van de virusinfectie nodig voor een juiste interpretatie. EBV-diagnostiek is gezien het frequent voorkomen van mononucleosisbeelden met een geheel verschillende infectieuze oorzaak geen academische zaak, doch juist in de eerstelijnszorg een behoefte. De rol die traditioneel de heterofiele antistofdiagnostiek speelt, wordt steeds beperkter naarmate virusspecifieke serologie beter uitvoerbaar wordt. In ieder geval vereist het toepassen van heterofiele antistoffen een aantal noodzakelijke voorzorgsmaatregelen om verantwoord te werken, geleid op beperkingen in zowel specificiteit als sensitiviteit.

### Dankbetuiging

Dr. M.J.D. van Tol en dr. M.F.C. Beersma waren zo vriendelijk het manuscript door te lezen en van kritisch commentaar te voorzien.

### Summary

Epstein-Barr-virus (EBV) infections can be demonstrated by detection of the virus as well as by detection of virus-specific antibodies. Antibody detection is the most practical approach and can provide detailed information on the course of an infection, by differentiation of the responses to separate viral antigens. The classical patterns produced in this way in stages of acute, recent, chronic active and latent infections are based on immunofluorescence techniques employing EBV-positive cell lines. More recently, the use of highly purified, recombinant or synthetic viral antigens in ELISA systems also enables accurate detection of EBV infections in different stages. The patterns produced by these assays are not necessarily exactly identical to those obtained by immunofluorescence methods. The newer techniques allow a wider application of EBV-specific serology. The use of heterophile antibody detection in the diagnosis of EBV infec-

tions requires a clear insight in the considerable limitations of this classical technique. This serological response is not virus-specific and its sensitivity is strongly age-dependent.

**Key words:** Epstein-Barr-virus, infectious mononucleosis, immunofluorescence, ELISA, heterophile antibodies, Paul-Bunnell test.

### Literatuur

- Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Brit J Surg* 1958; 45: 218-23.
- Epstein MA, Achong B, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 252-3.
- Henle G, Henle W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt lymphoma. *J Bacteriol* 1966; 91: 1248-56.
- Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1968; 59: 94-101.
- Van Gelder T, Kroes ACM, Mulder A, Gratama JW, Weimar W. A living related kidney donor as the source of a nearly fatal primary Epstein-Barr virus infection following transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 852-5.
- Kroes ACM, Pijl JW van der, Tol MJD van, et al. Rapid occurrence of lymphoproliferative disease after pancreas-kidney transplantation performed during acute primary Epstein-Barr virus infection. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 339-43.
- Rooney CM, Loftin SK, Holladay MS, et al. Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 1995; 89: 98-103.
- Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993; 342: 398-401.
- Rowe DT, Ou, Reyes J, et al. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1672-5.
- Khanna R, Burrows SR, Moss DJ. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol Rev* 1995; 59: 387-405.
- Marklund G, Ernberg I, Lundberg C, Henle W, Henle G. Differences in EBV specific antibody patterns at onset of infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis* 1986; 18: 25-32.
- Kroes ACM, Brouwer ML, Batenburg M van, Balk AHMM. Primary Epstein-Barr virus infection in an immunosuppressed patient: symptoms, serology and T cell response. *J Infect Dis* 1991; 163: 1355-7.
- Baer R, Bankier AT, Biggin, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984; 310: 207-11.
- Färber I, Wätzler F, Wholrabe P, Wolf H, Hinderer W, Sonnenborn HH. Serological diagnosis of infectious mononucleosis using three anti-Epstein-Barr virus recombinant ELISAs. *J Virol Meth* 1993; 42: 301-8.
- Wiedbrauk DL, Bassin S. Evaluation of five immunoassays for detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus viral capsid antigens. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1339-41.
- Grunsven WMJ van, Spaan WJM, Middeldorp JM. Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the B1-R13-encoded Epstein-Barr virus capsid protein. *J Infect Dis* 1994; 170: 13-9.
- Paul JR, Bunnell W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am J Med Sci* 1952; 183: 90-104.
- Editorial. Tests for infectious mononucleosis. *Br Med J* 1980; 1: 1153-4.

Dr. A.C.M. Kroes, medisch microbioloog  
Academisch Ziekenhuis Leiden  
Centraal Klinisch Virologisch Laboratorium E4-P  
Postbus 9600, 2300 RC Leiden  
E-mail: kroes@virology.azl.nl