

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

Полимеразная цепная реакция в оценке прогноза и мониторинге вируса Эпштейна—Барр-ассоциированной лимфомы Ходжкина

Н.А. Катин¹, И.В. Жильцов¹, В.М. Семенов¹, Д.К. Новик²

¹УО «Витебский государственный медицинский университет», пр-т Фрунзе, д. 27, Витебск, Республика Беларусь, 210023

²ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», ул. Ильича, д. 290, Гомель, Республика Беларусь, 246040

РЕФЕРАТ

В обзоре представлен анализ 34 статей, посвященных изучению полимеразной цепной реакции (ПЦР) в качестве метода определения ДНК вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) в биологическом материале у пациентов с ВЭБ-ассоциированными онкологическими заболеваниями, включая лимфому Ходжкина (ЛХ). Приводится сравнительный анализ различных методик определения ДНК ВЭБ в биологическом материале. ВЭБ связан с ЛХ в 20–100 % случаев в зависимости от географического региона и ВИЧ-статуса пациента. Для ВЭБ-ассоциированных ЛХ характерен тип латенции II. Установлено, что ВЭБ находится во всех атипичных клетках и может определяться в крови у пациентов с ВЭБ-ассоциированной ЛХ методом ПЦР. Представлены результаты различных исследований, в которых выявление ВЭБ методом ПЦР сравнивается с методами *in situ* гибридизации и иммуногистохимии при различных ВЭБ-ассоциированных онкологических заболеваниях, включая ЛХ. Полученные данные указывают на возможность использовать ПЦР для количественного определения ДНК ВЭБ в плазме у больных ЛХ при мониторинге эффективности лечения, оценке прогноза течения и развития рецидивов заболевания. Количественное определение ДНК ВЭБ с помощью метода ПЦР в режиме реального времени в плазме у пациентов с ВЭБ-ассоциированной ЛХ является перспективным методом. Для дальнейшего внедрения в практику необходимы стандартизация методики, проведение более крупных исследований, а также сопоставление с позитронно-эмиссионной томографией.

Ключевые слова: вирус Эпштейна—Барр, лимфома Ходжкина, полимеразная цепная реакция.

Получено: 20 декабря 2017 г.

Принято в печать: 28 февраля 2018 г.

LYMPHOID TUMORS

Polymerase Chain Reaction for Prognosis Assessment and Monitoring of the Epstein-Barr Virus-Associated Hodgkin's Lymphoma

MA Katsin¹, IV Zhil'tsov¹, VM Semenov¹, DK Novik²

¹Vitebsk State Medical University, 27 Frunze pr-t, Vitebsk, Republic of Belarus, 210023

²Republican Applied Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, 290 Il'icha str., Gomel, Republic of Belarus, 246040

ABSTRACT

The review provides the analysis of 34 papers on polymerase chain reaction (PCR) as a method of the Epstein-Barr virus (EBV) DNA detection in biological material of patients with EBV-associated cancer diseases including Hodgkin's lymphoma (HL). A comparative analysis of different methods of EBV DNA detection in biological material is presented. EBV is associated with HL in 20 to 100 % of cases depending on a geographic region and HIV status. EBV-associated HLs are characterized by latency type II. EBV is found in all the atypical cells and can be detected in blood of EBV-associated HL patients by means of the PCR method. The review includes the results of studies on EBV detection using the PCR method compared to *in situ* methods of hybridization and immunohistochemistry in various EBV-associated cancer diseases including HL. The obtained data indicate that PCR can be used for quantitative determination of EBV DNA in blood plasma of HL patients for therapeutic efficacy monitoring and prognosis assessment of disease and relapses. Quantitative determination of EBV DNA in blood plasma of HL patients using the real time PCR method is a promising technique. Its further practical application requires standardization of the method, larger trials, and comparison to positron emission tomography.

Keywords: Epstein-Barr virus, Hodgkin's lymphoma, polymerase chain reaction.

Received: December 20, 2017

Accepted: February 28, 2018

Для переписки: Иван Викторович Жильцов, д-р мед. наук, профессор, пр-т Фрунзе, д. 27, Витебск, Республика Беларусь, 210023; тел.: +375(29)7104368-93-29; e-mail: zhylytsou@tut.by

Для цитирования: Катин Н.А., Жильцов И.В., Семенов В.М., Новик Д.К. Полимеразная цепная реакция в оценке прогноза и мониторинге вирус Эпштейна—Барр-ассоциированной лимфомы Ходжкина. Клиническая онкогематология. 2018;11(2):182–6.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-182-186

For correspondence: Prof. Ivan Viktorovich Zhil'tsov, MD, PhD, 27 Frunze pr-t, Vitebsk, Republic of Belarus, 210023; Tel.: +375(29)7104368-93-29; e-mail: zhylytsou@tut.by

For citation: Katsin NA, Zhil'tsov IV, Semenov VM, Novik DK. Polymerase Chain Reaction for Prognosis Assessment and Monitoring of the Epstein-Barr Virus-Associated Hodgkin's Lymphoma. Clinical oncohematology. 2018;11(2):182–6.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-182-186

ВВЕДЕНИЕ

Вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ) является вирусом герпеса 4-го типа. Геном представлен двуспиральной ДНК из 172 000 пар оснований и кодирует более 80 генов. Вирус способен формировать в клетках инфекцию двух типов: литическую и латентную. До 90 % населения инфицируются, и впоследствии вирус пожизненно находится в В-клетках памяти и эпителиальных клетках в виде эписом, экспрессируя лишь некоторые гены латентности. Такая избирательная экспрессия генов позволяет ускользать от иммунного ответа и сохранять геном [1, 2]. Основными являются гены, кодирующие 6 нуклеарных антигенов (EBNA-1, -2, -3А, -3В, -3С и -LP), 3 латентных мембранных белка (LMP-1, -2А и -2В), неполиаденилированные РНК (EBER-1, -2) и транскрипты BamH1A (BART) [3]. В зависимости от набора экспрессируемых латентных генов выделяют 4 типа латенции ВЭБ (табл. 1) [2]. Различные типы латенции ВЭБ связаны с различными онкологическими заболеваниями. Установлено, что ВЭБ может участвовать в патогенезе и определяться в опухолевой ткани Т/НК-клеточных неходжкинских лимфом, лимфомы Ходжкина (ЛХ), Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, ВИЧ-ассоциированных лимфом, посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний, рака носоглотки и рака желудка [4]. Трансформирующий эффект ВЭБ демонстрируется *in vitro*, когда при добавлении циклоспорина В-лимфоциты здорового серопозитивного донора трансформируются в иммортализованную ВЭБ-положительную лимфобластодную клеточную линию [4, 5].

Для ВЭБ-ассоциированной ЛХ характерен тип латенции II. EBNA-1 экспрессируется при всех ВЭБ-ассоциированных онкологических заболеваниях, в т. ч. при ЛХ. Данный белок участвует в репликации генома ВЭБ, ингибирует апоптоз, запуская деградацию белка p53. LMP-1 — мембранный белок, который ингибирует апоптоз с помощью повышенной экспрессии белка bcl-2. Кроме того, он мимикрирует рецепторный

белок CD40, вызывая постоянную активацию транскрипционного фактора NF-κB. LMP-2А взаимодействует с тирозинкиназами Lyn и Syk, в результате чего происходит проведение внутриклеточного сигнала подобно В-клеточному рецептору, что препятствует апоптозу В-клеток в герминативном центре [6]. EBER-1 и -2 ингибируют апоптоз, противовирусную активность интерферона-α и -γ, а также индуцируют экспрессию интерлейкина-10 [3]. ДНК ВЭБ находится во всех опухолевых клетках и остается в них в течение всего заболевания [7].

В зависимости от географического региона связь ВЭБ с ЛХ варьирует от 20 до 100 % [8, 9]. У людей, перенесших инфекционный мононуклеоз, риск развития ВЭБ-ассоциированной ЛХ повышается в среднем через 4 года, а ДНК ВЭБ в плазме постепенно нарастает к моменту установления диагноза ЛХ [10]. Ассоциация с ВЭБ неравномерна при различных гистологических вариантах ЛХ. Так, например, ВЭБ-положительный статус наиболее часто обнаруживается у пациентов со смешанно-клеточным вариантом ЛХ (до 70 %) и практически не встречается при нодулярной с преобладанием лимфоцитов ЛХ [11]. У ВИЧ-инфицированных больных ВЭБ-ассоциированная ЛХ составляет 80–100 % случаев [12].

ДИАГНОСТИКА ВЭБ-АССОЦИИРОВАННЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время «золотым стандартом» подтверждения ВЭБ-статуса при ЛХ является метод EBER *in situ* гибридизации на биопсийном материале [13]. Главным положительным аспектом применения EBER *in situ* гибридизации является возможность визуализации ВЭБ в атипичных клетках ЛХ [8]. Однако тот факт, что атипичные клетки при ЛХ составляют 1–2 % всех клеток самой опухоли, может снижать чувствительность метода [3]. Более того, ДНК ВЭБ может определяться в мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров до 84 % случаев, и поэтому биопсийный материал здорового человека может содержать В-клетки, инфицированные ВЭБ, что может приводить к установлению ложноположительного результата по данным EBER *in situ* гибридизации [13, 14]. Кроме того, ложноположительный результат может наблюдаться в результате кросс-реактивности проб, а также при неспецифичном окрашивании [15]. В то же время мутации, делеции и реаранжировки генов ВЭБ могут давать ложноотрицательный результат [13]. В связи с этим неоднократно поднимался вопрос о

Таблица 1. Профиль экспрессии генов вируса Эпштейна—Барр при различных типах латенции

	EBER	EBNA-1	LMP-1, -2	EBNA-2, -3, -LP
Латенция III	+	+	+	+
Латенция II	+	+	+	–
Латенция I	+	+	–	–
Латенция 0	+	–	–	–

чувствительности метода EBER *in situ* гибридизации, т. к. в некоторых исследованиях положительный ВЭБ-статус подтверждался в EBER-негативных опухолях молекулярными и иммуногистохимическими методами. Например, в исследовании Z.-L. Qi и соавт. сравнивалась чувствительность методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием зондов и праймеров к региону BamH1W, иммуногистохимического исследования на LMP-1 и EBER *in situ* гибридизации на биопсийном материале. Самым чувствительным оказался метод ПЦР [16].

J.L. Ryan и соавт. сравнили методы EBER *in situ* гибридизации, иммуногистохимии и ПЦР для подтверждения ВЭБ-позитивности на биопсийном материале. Для определения ДНК ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры и зонды к различным участкам генома ВЭБ (BamH1W, EBNA-1, LMP-1, LMP-2, BZLF1), в результате чего была показана полная сопоставимость с EBER *in situ* гибридизацией при хорошей специфичности [17].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК ВЭБ В ПЛАЗМЕ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ВЭБ-АССОЦИИРОВАННЫМИ ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Первые сообщения о том, что количественное определение ДНК ВЭБ в плазме может отражать опухолевую нагрузку ВЭБ-ассоциированного онкологического заболевания, появились при изучении рака носоглотки. В исследовании Y.M. Lo и соавт. у 10 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом рака носоглотки еженедельно исследовали концентрацию ДНК ВЭБ в плазме на фоне проведения курсов лучевой терапии [18]. У 8 из 10 пациентов отмечалось резкое снижение концентрации ДНК ВЭБ, в то время как у 2 — изначальное его повышение с последующим падением. Чтобы уточнить кинетику снижения концентрации ДНК ВЭБ в плазме на фоне лечения, обследовали еще 5 больных с аналогичным диагнозом, у которых концентрацию ДНК ВЭБ в плазме измеряли ежедневно. Выяснилось, что у всех пациентов на фоне лучевой терапии отмечалось временное повышение концентрации ДНК ВЭБ в плазме в результате гибели клеток опухоли. Среднее время до достижения пиковой концентрации ДНК ВЭБ в плазме пациентов составило 3 дня (диапазон 1,8–5 дней), после чего у всех испытуемых отмечалось быстрое снижение концентрации ДНК ВЭБ. Среднее время полураспада ДНК ВЭБ в плазме пациентов составило 3,8 дня (диапазон 2,4–4,4 дня) [18].

В другом исследовании 11 пациентов были с рецидивами рака носоглотки после хирургического и лучевого лечения. Рецидивов не было у 7 из 8 пациентов, у которых после лечения изменился статус плазменной ДНК ВЭБ с положительного на отрицательный. Примечательно, что у всех 3 пациентов, у которых после хирургического лечения определялась ДНК ВЭБ в плазме, впоследствии развились рецидивы заболевания. Среднее время полураспада ДНК ВЭБ в плазме составило 139 мин, что свидетельствует о

быстрой элиминации ДНК ВЭБ [19]. Позже появились исследования, показывающие корреляцию между концентрацией ДНК ВЭБ и стадией, а также прогнозом заболевания [20].

В исследовании W.Y. Au и соавт. было показано, что у пациентов с НК/Т-клеточными лимфомами концентрация ДНК ВЭБ в крови до лечения коррелировала со стадией заболевания [21]. Больные, у которых концентрация ДНК ВЭБ в плазме до лечения была более $6,1 \times 10^7$ копий/мл, имели медиану общей выживаемости 2,1 мес., в то время у больных с ДНК ВЭБ в плазме менее $6,1 \times 10^7$ копий /мл медиана общей выживаемости была 54 мес. В настоящее время измерение ДНК ВЭБ в плазме у пациентов с ВЭБ-ассоциированными НК/Т-клеточными лимфомами/лейкозами используется для определения прогноза (высокая концентрация ДНК ВЭБ до начала лечения имеет отрицательное прогностическое значение), а также в мониторинге эффективности лечения [22].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК ВЭБ В ПЛАЗМЕ У ПАЦИЕНТОВ С ВЭБ-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОМОЙ ХОДЖКИНА

Первоначально было установлено, что у больных ЛХ повышено содержание свободной циркулирующей ДНК в плазме [23]. Логичным стало исследование свободной циркулирующей ДНК ВЭБ в качестве онкомаркера методом ПЦР в плазме и сыворотке у пациентов с ВЭБ-ассоциированной ЛХ. В ранних работах A. Gallagher было показано, что при исследовании сыворотки пациентов с ВЭБ-ассоциированной ЛХ методом стандартной ПЦР у 27 из 33 пациентов определялась ДНК ВЭБ. У пациентов с ВЭБ-отрицательной ЛХ ДНК ВЭБ была выявлена в 4 из 26 случаев, в то время как у здоровых доноров ДНК ВЭБ не определялась. Далее ученые провели аналогичное исследование, но с использованием ПЦР в режиме реального времени, которое позволило дополнительно выявить ДНК ВЭБ у 3 пациентов, имевших отрицательные результаты по данным стандартной ПЦР [24].

Установлено, что ДНК ВЭБ в плазме не является частью вирионов, а высвобождается из опухолевых клеток ВЭБ-ассоциированной ЛХ в плазму. Данный факт делает плазму наиболее предпочтительным источником для исследования ДНК ВЭБ [25]. Так, в исследовании K.I.K. Lei и соавт. у 11 пациентов с ВЭБ-ассоциированными лимфолиферативными заболеваниями в плазме определялось от 181 до 8379 копий/мл ДНК ВЭБ при использовании зондов и праймеров к BamH1W, а результаты коррелировали с EBER-позитивностью в биопсийном материале. При этом ДНК ВЭБ не определялась в плазме у здоровых доноров. У пациентов, которые отвечали на противоопухолевую терапию, уровень ДНК ВЭБ в плазме снижался, а у не отвечавших на лечение — значительно возрастал [26].

В другом исследовании M.K. Gandhi и соавт. сравнивали чувствительность и специфичность ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК ВЭБ в плазме и в мононуклеарных клетках периферической крови (МНПК) [27]. В исследование было включено

58 пациентов с различными стадиями заболевания и ВЭБ-статусом. Для определения использовались праймеры и зонды к ДНК ВЭБ полимеразы BALF5. При исследовании ДНК МНПК у 4 из 8 первичных пациентов с ВЭБ-положительной ЛХ было выявлено более 10×10^6 копий/мл, 10 копий/ 10^6 , в то время как исследование ДНК в плазме позволило обнаружить ДНК ВЭБ у всех 8 пациентов. Кроме того, ДНК ВЭБ была выявлена в МНПК у 26 % пациентов с ВЭБ-отрицательной ЛХ и у 57 % — с ВЭБ-положительной ЛХ в ремиссии. ДНК ВЭБ в плазме не определялась у пациентов с ВЭБ-отрицательной ЛХ и у всех пациентов в ремиссии. У 5 больных, у которых обнаруживались высокие концентрации ДНК ВЭБ в плазме до начала лечения (ВЭБ-положительные ЛХ), уровень ДНК ВЭБ снижался на фоне лечения до полного ее исчезновения. У 1 пациента ДНК ВЭБ определялась в плазме после проведенного лечения, несмотря на полную ремиссию по данным КТ и сцинтиграфии. Через 5 мес. у пациента был констатирован рецидив заболевания с увеличением концентрации ДНК ВЭБ в плазме в 10 раз. В итоге был сделан вывод о том, что определение ДНК ВЭБ в МНПК не может использоваться для оценки активности ВЭБ-положительной ЛХ, в то время как количественное определение ДНК ВЭБ в плазме обладает хорошей чувствительностью и специфичностью и требует дальнейшего изучения на большей группе пациентов [27].

S. Nohaus и соавт. для изучения ДНК ВЭБ при ЛХ включили в исследование 92 больных. Экстракция ДНК осуществлялась с помощью набора QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN). Использовались праймеры к гену EBNA-1 с определением в режиме реального времени с помощью SYBR green. Специфичность и чувствительность составили 90 и 65 % соответственно. Положительный ВЭБ-статус в биоптате и плазме коррелировал с более поздней стадией заболевания, наличием В-симптомов, повышенным содержанием интерлейкина-6 в крови, а также увеличением (> 5 %) макрофагов CD68+ по данным иммуногистохимического исследования. Пациенты с определяемой ДНК ВЭБ в плазме до лечения имели значительно худшие показатели выживаемости без прогрессирования [15].

В проспективном многоцентровом исследовании E2496 был обследован 121 пациент с ЛХ на наличие ДНК ВЭБ в плазме. ВЭБ-положительными оказались 24 больных, а ВЭБ-отрицательными — 92. Для определения ДНК ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени использовали праймеры и зонды к региону BamH1W. Среднее содержание ДНК ВЭБ в 1-й группе составило 3161 копия вируса/100 мкл, в то время как во 2-й группе — 0 копий вируса/100 мкл. При использовании пограничного значения 60 копий вируса/100 мкл определение ДНК ВЭБ в плазме достигло 96%-го соответствия с EBER *in situ* гибридизацией. Положительный статус ДНК ВЭБ в плазме до лечения был связан с худшими показателями выживаемости без прогрессирования, в то время как такой разницы не наблюдалось при стратификации по данным EBER *in situ* гибридизации. Пациенты, у которых ДНК ВЭБ определялась в плазме через 6 мес. после начала лечения, имели более худшие показатели выживаемости без прогрессирования [28].

M. Sinha и соавт. изучали целесообразность использования мониторинга ДНК ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени у больных ЛХ на фоне терапии. До лечения ДНК ВЭБ определялась в плазме у 16 из 44 пациентов с ЛХ. Средняя концентрация ДНК ВЭБ у этих больных составила 18×10^3 копий/мл (диапазон $1-51 \times 10^3$ копий/мл). У 5 пациентов, у которых ДНК ВЭБ определялась в плазме до противоопухолевого лечения, после его проведения она не обнаруживалась. У 4 из них документирована полная ремиссия, а у 1 — частичная [29]. Еще в одном исследовании для мониторинга ДНК ВЭБ было включено 165 больных ЛХ. У 22 пациентов с ВЭБ-положительной ЛХ ДНК ВЭБ определялась в плазме. Средняя концентрация ДНК ВЭБ в плазме составила 6000 копий/мл (диапазон 600–182 000 копий/мл). На фоне терапии ДНК ВЭБ в плазме уменьшалась у отвечавших на лечение пациентов. У 1 больного с полной ремиссией после 2 курсов полихимиотерапии по данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и отсутствием ДНК ВЭБ в плазме был выявлен рецидив заболевания вскоре после повторного повышения ДНК ВЭБ в плазме [30]. В другом исследовании была также продемонстрирована целесообразность использования количественного определения ДНК ВЭБ в плазме у детей с ЛХ для мониторинга эффективности противоопухолевого лечения [31].

Основным методом определения свободной циркулирующей ДНК ВЭБ в настоящее время является ПЦР в режиме реального времени. Тем не менее выбор универсальных праймеров, зондов, контрольной ДНК до сих пор не стандартизирован, что может отражаться на различиях в результатах исследований. Наиболее часто используются праймеры и зонды к региону BamH1W. Однако тот факт, что BamH1W может по-разному повторяться в вирусном геноме в зависимости от штамма (подштаммов) ВЭБ, поднимает некоторые практические вопросы интерпретации и стандартизации исследований с использованием таких праймеров и зондов [32]. В исследовании Q.-T. Le и соавт. для определения ДНК ВЭБ в плазме у пациентов с раком носоглотки использовали праймеры и пробы к BamH1W, а также к однокопийным ДНК-полимеразе (Pol-1) и латентному мембранному белку-2 (LMP-2). Тем не менее наибольшей чувствительностью характеризовалась ПЦР с использованием праймеров и зондов к BamH1W [33]. Еще одним фактором, влияющим на результат исследования, является метод экстракции ДНК. В исследовании M.T. Bortolin и соавт. продемонстрировано преимущество выделения ДНК с помощью хлороформ/фенольной экстракции по сравнению с коммерческим набором QIAamp DNA Mini kit [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая результаты многочисленных исследований, ДНК ВЭБ в плазме у пациентов с ЛХ может рассматриваться в качестве онкомаркера ВЭБ-ассоциированной ЛХ. В дальнейшем необходима стандартизация метода ПЦР в режиме реального времени для определения ДНК ВЭБ в плазме, а также проведение более масштабных клинических исследований с хорошо про-

думанным дизайном на большей группе пациентов. Это позволит установить клиническую значимость количественного определения ДНК ВЭБ в плазме у больных ЛХ для оценки прогноза и мониторинга эффективности противоопухолевого лечения.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: все авторы.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):75–82. doi: 10.1038/35095584.
- Murata T. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol Immunol.* 2014;58(6):307–17. doi: 10.1111/1348-0421.12155.
- Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI. Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2017;372(1732):20160271.
- Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene.* 2003;22(33):5108–21. doi: 10.1038/sj.onc.1206556.
- Rickinson AB, Rowe M, Hart IJ, et al. T-cell-mediated regression of 'spontaneous' and of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cell Immunol.* 1984;87(2):646–58. doi: 10.1016/0008-8749(84)90032-7.
- Manco C, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood.* 2007;110(10):3715–21. doi: 10.1182/blood-2007-05-090142.
- Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin Lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009;1(2):e2009013. doi: 10.4084/MJHID.2009.013.
- Flavell KJ, Murray PG. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol.* 2000;53(5):262–9. doi: 10.1136/mp.53.5.262.
- Weinreb M, Day PJ, Niggli F, et al. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child.* 1996;74(1):27–31. doi: 10.1136/adc.74.1.27.
- Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2004;125(3):267–81. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04902.x.
- Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer.* 1997;70(4):375–82. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970207)70:4<375::aid-ijc1>3.0.co;2-t.
- Dolcetti R, Boiocchi M, Ghoghini A, et al. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur J Cancer.* 2001;37(10):1276–87. doi: 10.1016/S0959-8049(01)00105-8.
- Gulley ML, Tang W. Laboratory Assays for Epstein-Barr Virus-Related Disease. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):279–92. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080023.
- Maurmann S, Fricke L, Wagner H-J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5419–28. doi: 10.1128/jcm.41.12.5419-5428.2003.
- Hohaus S, Santangelo R, Giachelia M, et al. The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(9):2885–92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3327.
- Qi Z-L, Han X-Q, Hu J, et al. Comparison of three methods for the detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's lymphoma in paraffin-embedded tissues. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):89–92. doi: 10.3892/mmr.2012.1163.
- Ryan JL, Fan H, Glaser SL, et al. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn.* 2004;6(4):378–85. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60535-1.
- Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(9):2351-5.
- To EWH, Chan KCA, Leung S-F, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3254–9.
- Zhao F, Liu X, Chen X, et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett.* 2015;10(5):2888–94. doi: 10.3892/ol.2015.3628.
- Au W-Y, Pang A, Choy C, et al. Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. *Blood.* 2004;104(1):243–9. doi: 10.1182/blood-2003-12-4197.
- Lei KIK, Chan LYS, Chan W-Y, et al. Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in natural killer/T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2002;8(1):29–34.
- Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1408–13. doi: 10.1093/annonc/mdp006.
- Gallagher A, Armstrong AA, MacKenzie J, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* 1999;84(4):442–8. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19990820)84:4<442::aid-ijc20>3.0.co;2-j.
- Chan KCA, Zhang J, Chan ATC, et al. Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res.* 2003;63(9):2028–32.
- Lei KIK, Chan LYS, Chan WY, et al. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol.* 2000;111(1):239–46. doi: 10.1111/j.1365-2141.2000.02344.x.
- Gandhi MK, Lambley E, Burrows J, et al. Plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA is a biomarker for EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):460–4. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2008.
- Kanakry JA, Li H, Gellert LL, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood.* 2013;121(18):3547–53. doi: 10.1182/blood-2012-09-454694.
- Sinha M, Rao CR, Shafiulla M, et al. Plasma Epstein Barr viral load in adult-onset Hodgkin lymphoma in South India. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2016;9(1):8–13. doi: 10.1016/j.hemonc.2015.11.004.
- Spacek M, Hubacek P, Markova J, et al. Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. *APMIS.* 2011;119(1):10–6. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02685.x.
- Welch JGG, Schwartz CL, Higman M, et al. Epstein-Barr virus DNA in serum as an early prognostic marker in children and adolescents with Hodgkin lymphoma. *Blood Adv.* 2017;1(11):681–4. doi: 10.1182/bloodadvances.2016002618.
- De Paoli P, Pratesi C, Bortolin MT. The Epstein Barr virus DNA levels as a tumor marker in EBV-associated cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(11):809–15. doi: 10.1007/s00432-007-0281-2.
- Le Q-T, Jones CD, Yau T-K, et al. A Comparison Study of Different PCR Assays in Measuring Circulating Plasma Epstein-Barr Virus DNA Levels in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5700–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0648.
- Bortolin MT, Pratesi C, Dolcetti R, et al. Clinical value of Epstein-Barr virus DNA levels in peripheral blood samples of Italian patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type. *Cancer Lett.* 2006;233(2):247–54. doi: 10.1016/j.canlet.2005.03.015.