

# 보체결합반응과 간접면역형광법을 사용한 Herpes Simplex Virus 감염의 혈청역학적 조사

이화여자대학교 의과대학 미생물학교실

박 해 경

= Abstract =

## Seroepidemiologic study of Herpes Simplex Virus Infection in general population using Complement Fixation Test and Indirect Immunofluorescence Test

Hae Kyung Park, M.D.

*Department of Microbiology, College of Medicine, Ewha Womans University*

One hundred and fifty-six sera from general population which were obtainable at Virology Lab, John Radcliffe Hospital, Oxford, U.K. during the period from January to June, 1979 were studied with Complement fixation test and indirect Immunofluorescence test in order to understand epidemiologic pattern of Herpes simplex virus antibodies.

An increasing tendency of Herpes simplex virus antibodies with age was observed by both methods in very similar pattern.

### 서 론

Herpes simplex virus (HSV)는 DNA virus로써 우리의 생활환경 어디에나 광범위하게 존재한다.

인체감염시 여러가지 질환을 일으키는데 이종에는 acute herpetic gingivostomatitis, eczema herpeticum, keratoconjunctivitis, meningoencephalitis, herpes labialis, genital herpes, neonatal herpes, traumatic herpes, herpetic whitlow, 그리고 acute herpetic rhinitis 등이 포함된다<sup>1-6)</sup>.

인체감염은 일차감염(primary infection), 반복감염

(recurrent infection)의 두가지 형태를 취한다.

일차감염은 이렇다할 증세를 나타내지 않기 때문에 모르고 지나치는 수가 많으나 이때에도 항체형성은 반드시 동반된다. 일차감염에 의하여 인체에 들어온 HSV는 흔히 sensory ganglia 등에 잔류하면서 잠복감염(latent infection)의 상태로 지속된다. 그러다가 숙주가 발열 파르 율경 emotional stress 등에 의해서 저항력이 낮아졌을 때에 다시 활성화되어 반복감염을 일으킨다<sup>7)8)</sup>.

HSV 감염을 검사하는 방법으로 보체결합반응(complement fixation test, CF test)이 사용되어 왔으나 최근에는 혈청내의 항체를 측정하는데 간접면역형광법

(indirect Immunofluorescence test, indirect IF test) 이 사용될 수 있음이 증명되어 관심을 끌고 있다. 후자의 방법은 전자에 비하여 간단하고 시간이 절약되면서도 동등한 예민성을 가지는 장점이 있다.

특히 집단조사(survey)를 위한 IF test의 의의는 매우 높으며 Grdner<sup>9)</sup> 등과 Kurtz<sup>10)</sup>의 보고가 이를 뒷받침한다.

저자는 1979년 1월부터 6월까지 영국 Oxford 지역의 일반인구집단(general population)을 대상으로 HSV에 대한 역학검사를 시행하였다.

이를 위하여 CF test와 indirect IF법 두가지를 병행하였으며 이는 검사방법으로써의 신빙성을 서로 비교해 보고자 함이었다. 이에 그 결과를 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### A. 재 료

#### 1) 혈 청

1979년 1월~6월까지 Oxford Virology Laboratory (John Radcliffe Hospital Oxford, U.K.)에 보내진 Oxford 지역의 general population 156명의 혈청을 사용하였다.

general population 으로서는 Virology Lab.에서 혈청학적으로 일반 virus 검사소견이 음성이고 특기할만한 질환을 최근에 앓은 경험이 없는 사람들을 선택하였다.

무균적으로 채취한 혈액에서 혈청을 분리하여  $-40^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 두었다가 각 연령층별로 무작위 선택하여 검사하였다.

#### 2) Complement fixation antigen

Herpes simplex CF Antigen은 Public Health Laboratory head quarters (Colindale Avenue London)에서 제조한 것을 사용하였다.

#### 3) Complement, hemolytic serum, anti-human IgG (sheep) fluorescein labelled, tissue culture medium, calf serum

Wellcome 회사제품(Wellcome Reserach Lab. Beckenham, U.K.) (Wellcome foundation Limited London, U.K.)을 사용하였다.

#### 4) Microplate, pipette, automatic dilutor, microshaker, mirror

Dynatech Lab. Limited Sussex U.K. 제품을 사용하였다.

### B. 방 법

#### 1) Complement fixation test

Four volume microtest를 disposable rigid polystyrene U plate를 사용했으며 여기에 0.025ml씩의 항원 환자혈청 complement 및 2% sensitized RBC를 첨가하였다.

혈청은  $56^{\circ}\text{C}$  30분 비동화하여 automatic dilutor로 첫번째 well이 1:4 되게하고 그 다음은 2배 계단희석하였다.

검사할 때마다 미리 antigen complement 2% sensitized RBC는 titration 한 후에 사용하였으며, antigen control antibody control 3HD<sub>50</sub> 1HD<sub>50</sub>  $\frac{1}{2}$  HD<sub>50</sub> cell control 등을 각 plate마다 대조로 동시에 test 하였다.

$4^{\circ}\text{C}$ 에 Overnight 후 hemolysis 4+ 3+를 mirror로 판독후 양성으로 reading 하였다.

#### 2) Indirect immunofluorescence test

Vero cell (Green monkey cell line)을 microscopic slide에 modified Eagle's medium에 10% calf serum을 넣고, penicillin 20,000 unit/ml streptomycin 100,000 unit/ml 등을 첨가해서 배양하였다.

세포배양한 slide에 Herpes simplex viurs (Oxford Virology Lab. 보관주)를 감염시켜서 aceton으로 고정하여  $-40^{\circ}\text{C}$ 에 두었다

Slide를 꺼내서 여기에 비동화한 혈청을 1:4로 희석하여 0.01ml을 micropipette으로 떨어트린 후 moist chamber에 incubation 후 washing 하고 anti-human IgG (Sheep) fluorescein labelled를 떨어트리 염색하였다.

이 때에 Vero cell에 virus를 감염시키지 않은 것을 대조로 했고 모든 검사에서 known titer의 양성 음성 혈청을 동시에 떨어트리 대조로 염색하여 비교하였다.

Glycerin을 mount하여 cover slip으로 덮고 형광 현미경으로 경검하여 양성 또는 음성으로 판독하였다.

## 성 적

#### 1) Oxford 지역의 일반인구군에서 complement fixation test에 의한 Herpes simplex virus의 항체 양성율

연령의 증가에 따라서 HSV의 CF 항체의 양성율은 증가하였다.

6개월에서 11개월 3/19(15.79%), 1세에서 19세 13/41(31.71%), 20세에서 39세 19/49(38.78%), 40세에서 59세 19/28(67.86%), 60세 이상에서 16/49(84.21%)였다(표 1 참조).

**Table 1.** Herpes simplex virus antibodies in general population with Complement Fixation Test

Age(yr) \ Result	CF negative ≤ 1 : 4	CF positive > 1 : 4	Positive rate (%)
6-11/12	16	3	3/19(15.79)
1-19	28	13	13/41(31.71)
20-39	30	19	19/49(38.78)
40-59	9	19	19/28(67.86)
60-	3	16	16/19(84.21)
Total	86	70	70/156

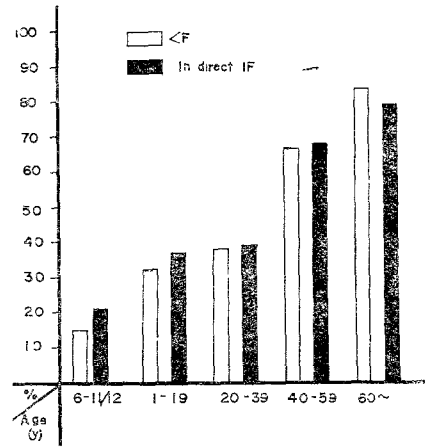
**Table 2.** Herpes simplex virus antibodies in general population with indirect Immunofluorescence Test

Age(ry) \ Result	Indirect IF negative	Indirect IF positive	Positive rate (%)
6-11/12	15	4	4/19(21.05)
1-19	26	15	15/41(36.59)
20-39	30	19	19/49(38.78)
40-59	9	19	19/28(67.86)
60-	4	15	15/19(78.95)
Total	84	72	72/156

2) Oxford 지역의 indirect Immunofluorescence test에 의한 Herpes simplex virus의 항체양성율

간접면역형광법으로 검사한 경우가 보체결합법보다 양성율이 높았고 또한 HSV 항체양성율은 연령과 더불어 증가하였다.

6개월에서 11개월 4/19(21.05%), 1세에서 19세 15/



**Fig. 1.** Percentage of CF test positive and indirect Immunofluorescence Test positive of Herpes simplex virus in general population.

41(36, 59%), 20세에서 39세 19/49(38.78%), 40세에서 59세 19/28(67.86%), 60세 이상에서 15/19(78.95%)였다(표 2 참조).

3) 보체결합법과 간접면역형광법에 의한 일반인구군의 Herpes simplex virus의 항체양성율의 비교도 1에서 보는 것과 같이 연령과 더불어 계속 증가를 보였다.

4) 보체결합법에 의한 일반인구군에서의 Herpes simplex virus의 항체가의 분포

표 3에서와 같으며 CF titer ≤ 1 : 4를 음성으로, ≥ 4을 양성으로 판독하였다.

156 case에서 CF 음성이 86 case, CF 양성인 70 case였다.

**Table 3.** Distribution of Herpes simplex virus antibodies titer in general population with Complement Fixation Test

Age(yr)	CF titer								Total
	<4 ≤4	4	≤8 8	≤16 16	≤32 32	≤64 64	≤128 128	≥128 >128	
6-11/12	16			1		1		1	19
1-19	28	1	1	1	5	2	2	1	41
20-39	30	1	1	3	7	2	3	2	49
40-59	9	1	2	3	6	3	4		28
60-	3			4		6	4	2	19
Total	86	3	4	12	18	14	13	6	156

**Table 4.** Correlation of Herpes simplex virus antibodies between Complement Fixation Test and indirect Immunofluorescence Test

CF Result	Indirect IF A test		Positive	Negative
	CF titer			
negative	<4 ≤4		3*	83
positive	4		2	1*
	≤8 8		3	2*
	≤16 16		11	
	≤32 32		18	
	≤64 64		13	1*
	≤128 128		13	
	≤128 >128		6	
Total			69	87

\* : disagreed

**Table 5.** Sensitivity and specificity of indirect Immunofluorescence Test for the detection of antibodies to Herpes simplex virus

CF test Result	Indirect IFA Result	True		False		% of sensitivity	% of specificity
		positive	negative	positive	negative		
Positive		66			4	94.29	96.51
Negative			83	3			

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{true positive}}{\text{true positive} + \text{false negative}} = \frac{66}{70} = 94.29$$

$$\text{specificity} = \frac{\text{true negative}}{\text{true negative} + \text{false positive}} = \frac{83}{86} = 96.51$$

## 고 안

Herpes simplex virus의 항체를 측정하려고 할 때 혈청학적으로 이용되는 방법으로

indirect hemagglutination (IHA) test

complement fixation (CF) test

neutralization (NE) test

direct or indirect immunofluorescence (IF) test

radioimmunological method

immune electrophoresis에 의한 방법 등이 있다.<sup>12-15)</sup>

본 실험에서는 위의 방법중 CF test와 indirect IF를 택해서 사용했는데 이는 Arthur는 사람의 HSV 항체측정에 IHA test와 CF test를 비교한 실험에서 CF test가 더 예민하다고 하였고, Johnson 등도 IHA test NE test indirect IF test의 세가지 방법으로 HSV 항체를 측정하여서 비교한 실험에서 이 세가지 중 indirect

## 5) Herpes Simplex virus의 항체양성률에서의 보체결합법과 간접면역형광법과의 관계

일반적으로 CF titer ≤1:4인 경우는 간접면역형광법으로 음성이었고, CF titer ≥:4인 경우는 간접면역형광법으로 양성을 나타내어 양성율이 거의 일치함을 보였다.

단 CF titer가 <1:4인 경우 3 case에서 간접면역형광법에 양성을 보여서 false positive로 간주하였다.

또 CFtiter가 1:4 case 1:64인 case 및 ≤1:8인 2 case에서 간접면역형광법으로 음성을 나타내어 false negative로 간주하였다(표 4 참조).

## 6) Herpes simplex virus의 항체측정에서의 간접면역형광법의 sensitivity와 specificity

Segar<sup>11)</sup> 등의 방식에 의해서 sensitivity는 94.29% specificity는 96.51%였다(표 5 참조).

IF test가 가장 예민하고 특이적이라고 한때 근거를 두고 있다.<sup>16)17)</sup>

많은 신생아들은 어머니로부터 피동적으로 항체를 얻으나 이 항체는 일반적으로 생후 6개월 후에는 거의 소실된다고 알려져서 본 실험에서는 생후 6개월 미만의 신생아는 제외하였다.

HSV 감염의 진단을 위해서 immunofluorescence법이 많이 이용되고 있는데 Gardner (1968)<sup>18)</sup> 등이 표재성 HSV 감염시에 안구자막 피부의 scraping한 검체를 가지고 direct IF법으로 항원을 발견하여 진단에 이 방법을 이용하였다.

Tomlinson (1974)<sup>19)</sup> 등은 herpes encephalitis 환자의 뇌조직에서 HSV 항원을 direct IF법으로 발견하였는데 이 결과와 뇌조직을 직접 조직배양해서 virus를 분리동정한 결과와 거의 일치하여서 direct IF법의 진단적 의의를 강조하게 되었다.

그러나 Cho<sup>19)</sup> 등은 동물실험모델(marmoset monk-

ey)에 herpes encephalitis 을 일으켜서 뇌조직을 가지고 direct IF 법으로 진단하면 신속하게 할 수는 있으나, focal lesion 인 경우와 뇌조직내에 virus 농도가 ( $\leq 3.5 \log_{10} 50\%$  tissue culture infective doses/g)로 낮은 active 감염 때에는 조직배양법을 이용하여 virus 를 분리동정하는 것이 진단에 도움을 준다고 하는 한계성을 발표하였다.

최근에는 direct IF 법에서 발견하여 indirect IF 법이 보급되고 있는데 이는 신속하고 예민하며 항상같은 결과를 가져오기 때문에 많이 이용하고 있다.

Cho<sup>20)</sup> 등이 herpes virus hominis 를 쥐에 감염시킨 후 얻은 brain frozen section 은 좋은 항원을 보유하고 있기에 indirect IF 법으로 혈청내의 herpes virus hominis 의 항체를 측정하기 가능하기에 임상적으로 이용될 수 있다고 하였다.

Indirect IF 법에서 본 실험에서 사용한 slide 에 조직배양을 한 후 virus 를 감염시켜 항원으로 간주하는 방법이, frozen section 을 사용하는 것보다 nonspecific 반응을 줄일 수 있다고 한다<sup>10)</sup>. 이 indirect IF test 에 의해서 일반인구군의 HSV 항체양성율을 측정 보고한 예는 것이 없어서 본 실험과의 비교가 곤란하였다.

HSV 항체를 측정 한 논문들이 있으나 이 중에서 본 실험과 연령분포가 다르고 검사방법이 달라서 비교가 어려웠으나 CF test 로 HSV 항체를 측정 한 문헌을 연령별로 나열하면 아래와 같다.

Baron<sup>21)</sup> 등이 대조군으로 택한 정상인 normocephalic children 에서의 HSV CF 항체 양성율은 4/44(9%)이었는데 본 실험의 결과보다 낮은 경우였고, HSV type 1 중화항체가 성별의 차이는 없고 26세 이전의 젊은 연령의 수혈자에서는 53%, 26세 이상의 수혈자에서는 54.8%이었다고 Roome<sup>22)</sup> 등이 보고하였다.

Gange<sup>23)</sup> 등은 연령을 밝히지 않은 건강한 병원 staff 에서의 혈청의 HSV CF 항체가 1:5 이상인 경우가 16/21(76.2%)라고 하였다, Wentworth<sup>24)</sup> 등이 시아틀 도시 중산층에서 HSV CF 항체양성율이 어린이에서 26%였고 연령과 더불어 양성율이 계속 증가하여, 40세 이후가 되면 70%로 증가한다고 한 결과는 본 실험과 거의 동일한 것으로 생각된다.

영국 미국에 있어서 성인인구의 HSV 중화항체 양성율은 40—90%라고 보고한 논문이 있으며<sup>3)</sup>, Gerber<sup>25)</sup> 등은 뉴기니아 마크로테시안 호주 터키 파라과이 등의 연령의 분포가 다양한 ( $2\frac{1}{2}$ ~56세) 154명에서 HSV CF 항체양성율을 측정하니 85~90%이었고, 정상인 26명의 혈청에서 HSV CF 항체가 적어도 10년간은 지속되는 것 같다고 발표하였다.

HSV 가 ubiquitous 한 virus 임을 보여주는 집단조사들이 있는데 Young<sup>26)</sup> 등은 미시간 치과대학생과 교수 1,031명을 인터뷰하여 perioral herpes 의 경험을 조사하였는데, 성별의 차이는 없고 학생군 17.7%, 교수군이 30.7%로 연령과 더불어 증가하였다는 보고가 있다.

Embil<sup>27)</sup> 등은 6대륙 21개국 48연구소 및 대학의 의과 치과 간호학전공 학생 및 캐나다 육군 보병 10,532명에게 설문지를 보내 응답한 결과를 분석한 결과 여자 28.0%에서 남자 33.2% recurrent herpes labialis 를 경험했음을 알아냈다.

위의 논문들을 종합하면 HSV 항체는 연령과 더불어 증가하는 듯하나 앞으로 연령층마다 많은 sample 을 동일한 사람이 specific 한 방법으로 측정하여 분석하여 발표하는 보고가 있었으면 한다.

## 결 론

저자는 1979년 1월부터 6월까지 영국 옥스포드 바이러시연구소에서 옥스포드 지역의 일반 인구집단에서 얻어진 156예의 혈청을 사용하여 Herpes simplex virus 의 감염에 대한 혈청역학적 연구를 시행하였다.

사용한 방법은 보체 결합반응과 간접 면역형광법이였다.

그 결과 아래와 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 일반인구군(156예)에서 Complement fixation 법과 indirect Immunofluorescence 법에 의한 Herpes simplex virus 의 항체양성율은 연령과 더불어 증가하였다.

2) CF test 에서 HSV 항체양성율은 6~11/12세 15.8%, 1세~19세 31.7%, 20세~39세 38.8%, 40세~59세 67.9%, 60세 이상 84.2%였다.

3) Indirect Immunofluorescence test 에서 HSV 항체양성율은 6~11/12세 21.1%, 1세~19세 36.6%, 20세~39세 38.8%, 40세~59세 67.9%, 60세 이상 79%였다.

4) HSV 항체양성율은 CF test 와 indirect IF test 에서 거의 비슷한 양상이었다.

5) HSV 항체를 측정하는데 사용한 indirect IF test 의 결과를 CF test 의 결과와 비교시 sensitivity 94.29% specificity 96.51%였다.

*<I am greatly indebted to Dr. J. O'H. Tobin (Director of Virology Laboratory, John Radcliffe Hospital Oxford U.K.) for continued encouragement, help and advice during this study>*

—References—

- 1) Fenner, F., and White, D.O. : Medical Virology. Second Ed. Academic Press. London, pp. 300—305, 1976.
- 2) Evans, A.S. : Viral Infections of Humans. First Ed. John Wiley & Son Ltd. New York, pp. 253—271, 1978.
- 3) Bader, C., Crumpacker, C.S., Schnipper, L.E., Ransil, B., Clark, J.E., Arndt, K., and Freedberg, I.M. : The Natural History of Recurrent Facial-oral Infection with Herpes Simplex Virus. *J. Infect. Dis.* 138 : 897—905, 1978.
- 4) Tobin, J. O'H. : Herpesvirus hominis Infection in pregnancy. *Proc. Roy. Soc. Med.* 68 : 371~374, 1975.
- 5) Francis, D.P., Herrmann, K.L., MacMahon, J.R., Chavigny, K.H., and Sanderlin, K.C. : Nosocomial and Maternally Acquired Herpesvirus hominis Infections. *Am. J. Dis. child.* 129:889—893, 1975.
- 6) Gershon, A.A., Irving, F., and Brunell, P.A. : Herpes Simplex Infection of the Newborn. *Am. J. Dis. child.* 24 : 739—741, 1972.
- 7) Pass, R.F., Whitley, R.J., Whelchel, J.D., Diethelm, A.G., Reynolds, D.W., and Alford, C.A. : Identification of patients with Increased Risk of Infection with Herpes Simplex Virus after Renal Transplantation *J. Infect. Dis.* 140 : 487—492, 1979.
- 8) Stevens, J.G., Cook, M.L. and Jordan, M.C. : Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus After Pneumococcal Pneumonia in Mice. *Infect. Immun.* 11 : 635—639, 1975.
- 9) Gardner, P.S., McQuillin, J., Black, M.M., and Richardson, J. : Rapid Diagnosis of Herpesvirus hominis Infection in Superficial Lesions by Immunofluorescent Antibody Techniques. *Brit. Med. J.* 4 : 89—92, 1968.
- 10) Kurtz, J.B. : Specific IgG and IgM Antibody Response In Herpes-Simplex-Virus Infections. *J. Med. Microbiol.* 7 : 333—341, 1974.
- 11) Segar, J.E., Smith, T.F., Ilstrup, D.M. : Evaluation of the FIAX Test for the Detection of Antibodies to Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus. *Am. J. clin. Pathol.* 75 : 387—390, 1981.
- 12) Stalder, H., Oxman, M.N., and Herrmann, K.L. : Herpes Simplex Virus Microneutralization: A Simplification of the Test. *J. Infect. Dis.* 131 : 423—430, 1975.
- 13) Nahmias, A.J., Chiang, W.T., Buono, I.D., and Duffey, A. Typing of Herpesvirus hominis strain by a Direct Immunofluorescent Technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132 : 386—390, 1969.
- 14) Marks M.I. : Rapid identification of Herpes simplex virus in tissue culture by direct immunofluorescence. *J. Lab Clin. Med.* 78 : 963—968, 1971.
- 15) Jeansson, S. : Differentiation between Herpes Simplex virus Type and Type 2 strains by Immuno electrophoresis. *Appl. Microbiol.* 24 : 96—100, 1972.
- 16) Arthus, F.B., and Schmidt, N.J. : Indirect Hemagglutinating Antibody Response to Herpesvirus Homnis type 1 and 2 in Immunized Laboratory Animals and in Natural Infection of man. *Appl. Microbiol.* 28 : 392—399, 1974.
- 17) Johnson, L.D., Fuccillo, D.A., Stalder, H., Oxman, M.A., Fraser, C.E.O., and Madden D.L. : Comparison of Hemagglutination and Indirect Immunofluorescence Test with Microneutralization Test for Detection of Type-specific Herpesvirus-hominis Antibody. *J. clin. Microbiol.* 9 : 384—390, 1979.
- 18) Tomlinson, A.H., Chinn I.J., and MacCallum, F.O. : Immunofluorescence staining for the diagnosis of Herpes encephalitis. *J. Clin. Path.* 27 : 495—499, 1974.
- 19) Cho, C.T., and Feng, K.K. : Sensitivity of the Virus Isolation and Immunofluorescent Staining Methods in Diagnosis of Infections with Herpes Simplex Virus. *J. Infect. Dis.* 138 : 536—540, 1978.
- 20) Cho, C.T., Feng, K.K., Brahmocupra, N., and Liu, C. : Immunofluorescent Staining for the measurement of Antibodies to Herpesvirus. hominis. *J. Infect. Dis.* 132 : 311—315, 1975.
- 21) Baron, J., Youngblood, L., Siewers C.M.F. and Medearis, D.M., Jr. : The Incidence of Cyomegal-

- ovirus, Herpes Simplex, Rubella, And Toxoplasma Antibodies in Microcephalic, Mentally Retarded, And Normocephalic Children. *Pediat.* 44 : 932—939, 1969.
- 22) Roome, A.P.C.H., Montefiore, D., and Waller, D.: Incidence of Herpesvirus hominis antibodies among blood donor populations. *Brit. J. Vener. Dis.* 51 : 324—330, 1975
- 23) Gange, R.W., De Bats, A., Park, J.R., Bradstreet, C.M.P., and Rhodes, E.L.: Cellular immunity and circulating antibody to herpes simplex virus in subjects with recurrent herpes simplex lesions and controls as measured by the mixed leukocyte migration inhibition test and complement fixation. *Brit. J. Derm.* 97 : 539—544, 1975.
- 24) Wentworth, B.B., and Alexander, R.: Seroepidemiology of Infections due to members of the Herpesvirus group. *Amer. J. Epi.* 94 : 496—507, 1971,
- 25) Gerber, P., and Rosenblum, E.N.: The Incidence of Complement-Fixing Antibodies to Herpes Simplex and Herpes-Like Viruses in man and Rhesus Monkeys. *Proc Soc Exp Biol Med* 128 : 541—546, 1968.
- 26) Young, S.K., Rowe, N.H., and Buchanan, R.A.: A Clinical study for the control of facial mucocutaneous herpes virus infections. *Oral Surg.* 41 : 498—507, 1976.
- 27) Embil, J.A., Stephen, R.G., and Manuel, R.: Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *CMAJ* 113 : 627—630, 1975.
-