



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA
CAUSADA POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR
(Modalidad: Investigación)

RISELA LUISANA MORALES HURTADO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANA, 2010

VALUACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA
CAUSADA POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR
(Modalidad: Investigación)

APROBADO POR:

Prof. Marcos De Donato
Asesor

Prof. Maria Zulay Sulbarán.
Jurado Principal

Prof. Yoleida Rodríguez
Jurado Principal

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	10
Población de Estudio y Toma de Muestras	10
Determinación de Anticuerpos tipo IgM e IgG Contra EBV	11
Extracción y Purificación del ADN	12
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	13
Análisis Estadístico	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXO.....	34
APÉNDICE.....	36
HOJA DE METADATOS	40

DEDICATORIA

A

Dios y a mi Virgen de Guadalupe, por acompañarme cada día de mi vida.

Mis bellos y amados padres, ustedes han sido mi guía y mi camino a seguir, sin ustedes nada de esto sería posible, los amo.

Mi esposo Biagio, por su comprensión, paciencia y amor incondicional a pesar de los tropiezos y adversidades. Gracias Gordo, te amo.

Mi familia que es muy grande, sus consejos fueron de mucha ayuda, espero ser un orgullo para mis tíos y un ejemplo para mis primos, mil gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

A

La prof. Yoleida Rodríguez, por su ayuda y guía al inicio de este trabajo.

Mi asesor Dr. Marcos De Donato, por aportar los conocimientos necesarios para la realización de éste trabajo.

La Lcda. Hectorina Rodulfo, por su ayuda profesional y su importante orientación en el procesamiento de muestras y elaboración de mi tesis. Gracias.

La Lcda. Ivanova Arenas, por su ayuda en la recolección de las muestras.

El Lcdo. Aldo Guzmán, por su ayuda, comprensión, amistad y apoyo incondicional en los momentos que más lo necesité, sin ti esto no sería posible. Mil Gracias Aldo.

Mis compañeras y amigas: Paola Díaz, Cinthia Tovar, Rosalyd Arias, Maria Eugenia Rodríguez, Celenys Vizcaino, Laura Díaz, Milena Blanco, Dulce Alfonzo, Evelin Marcano, Yelitza Farias, Maira Espinoza e Indira Larez, gracias por ser mi apoyo en todo momento, las quiero amis.

Carmen Luisa Chópite, mi segunda madre, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón como a una hija más. Muchísimas gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de anticuerpos IgM y/o IgG anti VCA contra el EBV, a través del método inmunoenzimático ELISA, en individuos que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008.....	15
Tabla 2. Frecuencia de individuos positivos a IgG para citomegalovirus y la asociación estadística por la prueba de Kappa entre IgG anti CMV e IgM y/o IgG anti VCA para el EBV por el método inmunoenzimático ELISA, que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008.....	16
Tabla 3. Grupos controles utilizados para la estandarización de la técnica de PCR en relación con la prueba serológica para detectar anticuerpos IgM y/o IgG contra el EBV.	17
Tabla 4. Frecuencia de individuos con anticuerpos IgM y/o IgG anti VCA contra el EBV, con respecto a la detección por PCR del ADN, en individuos que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008.....	18

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Bandas de ADN genómico de 17 muestras experimentales (pozos 1-17), corridas en gel de agarosa al 1,0% y coloreado con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml. λ: patrón de ADN del bacteriófago lambda con 200 ng. 16
- Figura 2.** Detección del EBV en muestras de pacientes, mediante amplificación por PCR de un fragmento de 213 pb del gen que codifica para la proteína del antígeno nuclear 1 del EBV (EBNA1), corrido en gel de agarosa al 2,0% y coloreado con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), EBV: control positivo, CN: control negativo (agua), CMV: muestra positiva para CMV y muestras de los pacientes en estudio..... 17

RESUMEN

La mononucleosis infecciosa (MI) es una enfermedad causada más frecuentemente por el virus Epstein-Barr (EBV), con sintomatología y serología inespecífica que dificulta la identificación del agente causal. Con el propósito de optimizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de MI causada por el virus Epstein-Barr, se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos IgM e IgG contra el antígeno de la cápside viral (VCA), mediante el método ELISA, y el ADN del virus mediante la técnica de PCR, en 86 pacientes de sexo masculino y femenino, con edades comprendidas entre 2 y 60 años, con sintomatología sugestiva de MI, que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, entre el período de mayo de 2007 y mayo de 2008. También se analizaron, por PCR, controles positivos y negativos al EBV, así como seropositivos a otros agentes infecciosos como el CMV, virus del dengue y VIH, por el método ELISA. Del total de individuos evaluados, la mayor frecuencia (75/86; 87,2%) resultó positivo para anticuerpos anti EBV. En el total de seropositivos, se halló una prevalencia para la IgG anti VCA del 40,7%, mientras que la IgM anti VCA mostró un porcentaje menor (18,6%) y un 27,9% de los individuos presentó tanto IgG como IgM anti VCA. En 32 pacientes también se encontró la presencia de IgG para CMV, donde la mayor frecuencia (59,3%) coincidió de forma significativa con la presencia de IgG anti VCA contra el EBV. La PCR evaluada confirmó el control positivo para EBV donado por un laboratorio externo. La misma logró detectar ADN del EBV en 8 de los pacientes seropositivos, de los cuales 4 mostraron anticuerpos IgM e IgG anti VCA, 1 presentó sólo IgM anti VCA y 3 exhibieron sólo IgG anti VCA. Los individuos seronegativos al EBV también se hallaron negativos a este virus mediante la PCR.

Palabra y/o Frases Claves: Epstein-Barr, Reacción en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓN

La mononucleosis es una enfermedad infecciosa aguda, febril y autolimitada, producida con mayor frecuencia por el virus Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), el cual pertenece a la familia *Herpesviridae*, y a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*; este virus mide aproximadamente 100 nm, su simetría es icosaédrica, con envoltura externa rica en glucoproteínas y una nucleocápside donde está contenido el genoma, el cual está constituido por una doble cadena de ADN lineal de 172 kb en las partículas virales y en forma de episoma (ADN circular o no integrado) en el interior del núcleo de las células infectadas. El ADN vírico posee dos secciones, una larga (UL) y otra corta (US), flanqueadas cada una de ellas por una región terminal repetitiva denominada TR y zonas de repetición interna (IR). Las regiones U3 y U5 de la sección UL del genoma permiten al virus realizar su replicación en la infección lítica. En cambio, el mantenimiento del episoma y de la replicación en la infección latente se debe a la región oriP de la zona denominada U1 de US (Young y Murray, 2003; Gimeno y cols., 2005; Mate y cols., 2009).

Como el resto de los herpesvirus es capaz de persistir de por vida de forma latente en el organismo y de recidivar. Tiene un especial tropismo por los linfocitos B y T y por el epitelio escamoso de la nasofaringe. La latencia se establece en los linfocitos B no proliferativos de la sangre periférica, en el tejido linfoide y en la orofaringe. La infección por este virus *in vitro* puede immortalizar los linfocitos B (Crespo y Paniagua, 2009).

El EBV infecta a gran parte de la población mundial de forma asintomática o inespecífica, afectando principalmente a los niños menores de 5 años. Los pacientes adolescentes o adultos jóvenes que permanecen susceptibles, desarrollan tradicionalmente el cuadro de mononucleosis infecciosa. Durante la primera fase de esta infección, más del 10,0% de los linfocitos de sangre periférica están infectados por el virus, al final su número se reduce a unos pocos por millón que persisten indefinidamente (Fica, 2003). De todos los casos de pacientes con sintomatología sugestiva de mononucleosis en que se consigue

conocer la etiología, un 90,0% está producido por el EBV; el 10,0% restante podría tener su origen en las infecciones por *Toxoplasma gondii*, adenovirus, el citomegalovirus (CMV) o el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En las personas mayores de 25 años, el agente etiológico más frecuente de mononucleosis infecciosa es el CMV (Mendoza y Rojas, 2009).

Esta enfermedad se adquiere, en general, por el contacto con secreciones orales (saliva) y se ha planteado que existen 2 fases: lítica y latente en la infección causada por el EBV. En estudios *in vitro* se ha comprobado que, la infección de las células epiteliales por el EBV origina infección lítica, con replicación activa y lisis de la célula. Por el contrario, la infección de los linfocitos B por el EBV origina una infección latente con inmortalización de las células. En las células B, el EBV se adhiere por la interacción de la glicoproteína gp350/220 de la envoltura del EBV con la molécula CD21 de la célula B, la cual actúa como el receptor celular para el EBV y es también el receptor para el componente C3b del complemento. Las membranas se fusionan, permitiendo la entrada del EBV en el citoplasma celular. Tras infectar las células B, la partícula de EBV es decapsidada y el genoma es transportado al núcleo celular, el ADN pasa de ser lineal a circular, formando un episoma donde el genoma generalmente permanece latente en estas células B, siendo en esta forma circular resistente a los antivirales. La producción de nuevos viriones infectan las células contiguas. La replicación viral se activa espontáneamente, y únicamente en una pequeña proporción de células B con infección (Dewhurst, 1999; Cohen, 2000; Crespo y Paniagua, 2009).

En el ciclo lítico se produce replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos viriones, mientras que, en la fase de latencia se producen sólo algunas proteínas y no se desarrollan viriones. El conocimiento de las proteínas es básico para comprender su papel en la patogenia del virus, y su utilidad en las pruebas diagnósticas. Durante la fase latente se produce gran cantidad de ARN nuclear no codificante (EBER1 y 2), seis antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C y LP) y tres proteínas de membrana (LMP1, 2A y 2B). En cambio, en las fases líticas se expresan unas 90 proteínas, entre las

que se sintetizan los antígenos precoces (EA) y los antígenos tardíos de la cápside del virus (VCA). Las diferencias entre los genes que codifican las proteínas EBNA 2, 3A y 3C permiten distinguir los dos subtipos del virus, denominados EBV 1 y 2. La proteína del EBNA-1 se une al ADN viral y permite que el genoma del EBV se mantenga en la célula B en forma circular (episoma). El EBNA-2 aumenta la expresión de las proteínas latentes de membrana LMP1 y LMP2, así como proteínas celulares que contribuyen al crecimiento y transformación de las células B. La proteína EBNA-3 regula la expresión de genes celulares, mientras que la proteína EBNA líder aumenta la capacidad del EBNA-2 para incrementar la expresión de la LMP-1. La LMP-1 actúa como un oncogén, y la expresión de esta proteína en ratones transgénicos produce linfomas B (Cohen, 2000; Vera y cols., 2003; Mate y cols., 2009).

En humanos, ambos tipos de infección están muy interrelacionadas. Así, la infección lítica por el EBV generalmente ocurre tras el contacto con secreciones orales, y en la orofaringe infecta directamente las células B de reposo o las células epiteliales, las cuales a su vez infectan a las células B. El virus se replica en las células de la orofaringe, y todas las personas seropositivas eliminan el virus en la saliva. Se cree que las células B pueden infectarse a partir del contacto con las células epiteliales y/o infectarse directamente de las células B de la orofaringe. En la infección primaria, las células B infectadas sufren una infección lítica con producción de virus y expresan la totalidad de las proteínas virales. Estas células son mantenidas bajo control por las células NK y por las células T citotóxicas. Tras la convalecencia se pasa a la infección latente y se cree que el lugar de persistencia del EBV, dentro del organismo, son las células B de memoria (Cohen, 2000; Crespo y Paniagua, 2009).

Cuando las células B infectadas circulan, diseminan la infección por todo el organismo, produciéndose un síndrome general y dando origen a una respuesta humoral y celular, incluyendo el desarrollo transitorio de anticuerpos heterófilos y persistente de anticuerpos específicos frente al EBV, como los anticuerpos de tipo IgM que aparecen de 3 a 6 días después del inicio de los síntomas e IgG cuya aparición es prácticamente

simultánea a la de las IgM anti-VCA y anti-EA-D; los anticuerpos IgM anti-EBNA aparecen durante el primer mes tras la infección. El período de incubación es de 30 a 40 días, seguido de un período prodrómico de 7 a 14 días, con una duración del período sintomático de 2 a 4 semanas. Una vez producida la enfermedad confiere una inmunidad muy duradera, probablemente para toda la vida (Navarro, 2000).

Los síntomas y signos de la mononucleosis infecciosa (MI) asociada al EBV, se presentan con un cuadro febril de magnitud variable de varios días de duración (2 a 4 semanas), faringitis asociada a exudado en 30,0% de los casos y adenopatías cervicales anteriores y posteriores. Durante el período prodrómico se observa decaimiento, anorexia, fatigabilidad, cefalea y fiebre. Los síntomas alcanzan habitualmente, su mayor intensidad al final de la primera semana y declinan progresivamente durante las próximas semanas. Los pacientes afectados presentan una linfocitosis mayor o igual al 50,0% y un recuento de linfocitos atípicos mayor o igual al 10,0% (Fica, 2003).

La infección crónica activa por EBV, se manifiesta clínicamente por la persistencia de los síntomas asociados con la infección por el EBV o sus complicaciones, por un período mayor de 1 año. Puede tratarse de manifestaciones benignas de enfermedad (fiebre, fatiga, adenomegalias, hepatoesplenomegalia) que no comprometen la vida o más severas: hematológicas (citopenias, aplasia medular, histiocitosis maligna), neurológicas, pulmonares, cardíacas, renales, oculares, entre otros, que pueden terminar con la muerte. Estos enfermos tienen títulos muy elevados de anticuerpos anti-VCA y anti-EA y bajos o ausentes anti-EBNA. En ellos, hay evidencias de laboratorio de replicación viral activa y la carga viral plasmática es alta (Alfieri y cols., 2000; López, 2009). El diagnóstico diferencial con otras etiologías causantes de síndrome mononucleósido, en primer lugar, se debe realizar con el citomegalovirus (CMV) que puede ocasionar entre otros, un cuadro clínico similar al EBV con AH negativos, y en segundo lugar, el VIH, el cual puede ocasionar en la etapa de primoinfección, una enfermedad similar a la mononucleosis infecciosa (López, 2009).

El diagnóstico de la MI es clínico, pero las pruebas de laboratorio son esenciales para la confirmación de la causa. Con este cuadro clínico y como prueba de diagnóstico, puede realizarse una prueba de Paul-Bunnell o detección de anticuerpos heterófilos en el suero (Monotest). Los anticuerpos heterófilos (AH) son inmunoglobulinas de la clase IgM dirigidas contra antígenos presentes en la superficie de los eritrocitos de diferentes especies. La prueba de Paul-Bunnell, se realiza mediante una técnica de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno purificado a partir de membranas de eritrocitos bovinos u ovinos. Los AH se unen con baja afinidad a las proteínas del EBV, en caso de resultar positiva esta prueba, se establece el diagnóstico de MI. Sin embargo, aunque es la técnica de diagnóstico utilizada con mayor frecuencia, aproximadamente del 15,0 al 20,0% de los pacientes con EBV asociado a MI resultan negativos para AH, y este porcentaje es mayor en niños menores de 5 años, llegando a alcanzar hasta un 50,0%. Por otro lado, se pueden presentar títulos significativos de anticuerpos de otras enfermedades que originan reacciones cruzadas, y que pueden arrojar resultados falsos positivos (Vera y cols., 2003; Mendoza y Rojas, 2009).

La serología específica debe ser utilizada como diagnóstico de MI por EBV en pacientes que exhiben presentaciones atípicas, severas o enfermedad prolongada con AH negativos o positivos. El método de ensayo inmunoenzimático (ELISA) constituye el método de elección para la detección de estos anticuerpos, utilizando antígenos nucleares sintéticos de EBV se puede demostrar la presencia de anticuerpos de tipo IgM, desde los 3 a 6 días después del inicio de los síntomas. La técnica de ELISA ha permitido un gran avance en el diagnóstico serológico del EBV, con ensayos que pueden ser cuantitativos y cualitativos y que detectan anticuerpos de la clase IgG e IgM. La especificidad en la detección de los anticuerpos IgG es muy elevada, por encima del 98,0%. Esta técnica se emplea para detectar anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos, tales anticuerpos son: los del tipo IgM anti antígenos de la cápside viral (IgM anti VCA), que se elevan en fase aguda y son muy útiles para establecer el diagnóstico de la infección, mientras que los del tipo IgG anti VCA, se elevan poco después del comienzo de la infección e indican infección antigua, y los anticuerpos séricos contra el

EBNA, que solo están presentes varias semanas o meses después del comienzo de la infección, por lo tanto no detectaría la infección aguda (Pérez y cols., 1995; Fica, 2003).

Según Ternak y Szucs (1997) la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas en la detección de anticuerpos contra el EBV son superiores a 87,5%. Sin embargo se puede presentar reacción cruzada en las pruebas de ELISA para anticuerpos IgM e IgG anti VCA, principalmente con el factor reumatoide, siendo más frecuente en los ancianos.

Al estudiar la prevalencia de anticuerpos contra el EBV en pacientes que asistieron al Laboratorio Clínico Universitario Rental Sucre, Cumaná, estado sucre, Rodríguez (2005) reportó una prevalencia de la IgG anti VCA de un 75% (24 casos). Guzmán (2006) realizó un estudio en 88 pacientes, a los cuales se les diagnosticó mononucleosis infecciosa por EBV mediante dos métodos serológicos distintos: Monotest y Elisa, este último de las casas comerciales Diasorin y BioLine. A través de la prueba Monotest, 12 (13,6%) de los pacientes resultaron positivos y 76 (86,4%) negativos. Mediante la técnica de ELISA (Diasorin) se determinó IgM anti-VCA en 6 (6,8%) pacientes, resultando negativos 82 (93,2%). De las muestras IgM anti-VCA positivas para anticuerpos contra el EBV, sólo un paciente (1,1%) coincidió con el diagnóstico para anticuerpos heterófilos.

El EBV, puede cultivarse a partir de secreciones orofaríngeas o linfocitos circulantes en un 80,0-90,0% de pacientes con mononucleosis infecciosa aguda. Este método, tiene poco valor diagnóstico pues el virus puede también cultivarse de la orofaringe de personas sanas (Losa y cols., 1998).

Existen otras técnicas diagnósticas basadas en biología molecular, las cuales son altamente específicas y básicamente son aplicables a cualquier problema diagnóstico asociado a procesos biológicos, incluyendo la infección causada por el EBV. Una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual fue descrita por

primera vez en 1985 por Kary Mullis, y se basa en la amplificación enzimática *in vitro* de un fragmento específico de ADN. A partir de ese momento, se ha producido un crecimiento progresivo tanto de las modificaciones del método original, como de sus diferentes aplicaciones. En la corta historia de la biología molecular, el surgimiento de nuevas técnicas como PCR ha revolucionado totalmente la forma de abordar problemas biológicos básicos y aplicados; y de una manera análoga a la técnica, se ha producido una acumulación exponencial de los usuarios en todas las áreas de la biomedicina. La importancia de esta técnica radica en su aparente sencillez, y en la alta sensibilidad y especificidad con que se obtienen resultados exitosos (Mullis, 1990; Comach y cols., 1998; Corvalán y cols., 2003).

En cuanto a su utilización en virología, la técnica de PCR ha producido resultados exitosos en el diagnóstico rápido de infecciones y/o enfermedades producidas por estos agentes infecciosos, obteniendo resultados comúnmente en 24 horas que no dependen ni de la multiplicación viral en cultivos *in vitro*, ni de la producción de anticuerpos en el hospedador. Además, ésta minimiza problemas asociados con el aislamiento viral, como la pérdida de la viabilidad del virus como consecuencia de una conservación o almacenaje inadecuado de la muestra o la existencia de anticuerpos neutralizantes en el suero del paciente. Aún más, la PCR hace factible detectar aquellos aislamientos virales que se adaptan precariamente a los cultivos celulares (Satz y Kornblihtt, 1993; Comach y cols., 1998).

En un estudio realizado por Hubert y cols. (2000), se aplicó el ensayo de PCR en tiempo real para detectar y cuantificar el ADN del EBV en muestras de sueros, esta técnica les permitió detectar bajos niveles de este virus en 21 (19,2%) de 109 pacientes con trasplante de órganos, con una carga viral promedio de 440 copias/ml, y en 16 (72,7%) de 22 pacientes con MI con un promedio de 6 400 copias/ml, mostrando diferencias altamente significativas con el grupo control, el cual estuvo conformado por 100 individuos sin síntomas de MI. Sugiriendo que los individuos positivos a MI que no presentaron carga viral, posiblemente se debió al momento en que se realizó la toma de

muestra. A pesar de ello, la técnica de PCR en tiempo real demostró ser altamente reproducible para la evaluación de EBV en pacientes inmunosuprimidos, los cuales estaban constituidos por los pacientes trasplantados, con bajas cargas virales.

El EBV, además de ser el agente etiológico de la MI, se asocia con un espectro muy amplio de neoplasias linfoproliferativas que incluyen el linfoma de Burkitt, la enfermedad de Hodgkin, los linfomas de células T, el granuloma letal de la línea media y los procesos linfoproliferativos de células B (Pagano, 2002). También, se ha implicado en el desarrollo del carcinoma epidermoide de amígdala palatina y carcinoma supraglótico. López y cols. (2003) consideraron que, este virus puede ser aislado en el 22,0-53,0% de los frotis faríngeos, por lo que se podría detectar el ADN del virus con alta frecuencia incluso en tejidos no patológicos, utilizando PCR. En otros estudios se detectaron mediante hibridación *in situ*, linfocitos pequeños y esporádicos infectados por el EBV dentro de tejido tumoral.

La detección de ADN del EBV en suero por PCR, es el criterio diagnóstico de infección aguda por EBV en los casos de pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas que desarrollan MI aguda, debido a que pueden tener respuestas serológicas atípicas: falta de anticuerpos anti VCA y anti EA, pero lo más importante es el no desarrollo de anti-EBNA (López, 2009).

Según Méndez y Pérez (2004), la humanidad se encuentra en una situación en la que es prioritaria la optimización de la lucha contra las enfermedades infecciosas. Como parte de este gran objetivo global, la microbiología clínica necesita optimizar a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez, la detección de agentes infecciosos, lo cual permitirá ejecutar programas adecuados de prevención y tratamiento de estas enfermedades, es así como la evaluación de la PCR para detectar EBV reviste de gran importancia, puesto que el mismo está relacionado con el desarrollo de ciertos tipo de cáncer, por lo que una detección temprana y específica del mismo permitiría la aplicación oportuna de tratamiento. La ventaja principal de la PCR, radica en que puede

evidenciar una infección, aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica, lo que permite disminuir la transmisión de infecciones virales, como en el caso del EBV, especialmente en aquellos casos donde resulta complejo su diagnóstico (McIntosh, 1996; Crespo, 2000).

Generalmente, suele ser difícil establecer un diagnóstico preciso de la MI causada por el EBV, debido a que otros agentes infecciosos pueden causar síndromes similares; además, actualmente se emplean métodos serológicos como la determinación de anticuerpos heterófilos y los ensayos inmunoenzimáticos ELISA, aunque con esta última prueba, en algunos casos, se pueden presentar títulos significativos de anticuerpos de otras enfermedades que originan reacciones cruzadas y pueden arrojar resultados falsos positivos y negativos. Por esta razón, se hace necesaria la optimización de la PCR por su alta sensibilidad y especificidad en la detección, identificación y cuantificación del EBV, lo que garantiza resultados confiables para el diagnóstico de esta infección. En base a ello, en el presente estudio se planteó como objetivo general evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de MI causada por el EBV.

METODOLOGÍA

Población de Estudio y Toma de Muestras

Para este trabajo de investigación se recolectaron muestras de sangre completa de 86 pacientes masculinos y femeninos, con edades comprendidas entre 2 y 60 años, con sintomatología característica de MI (siendo los síntomas más comunes fiebre, ganglios linfáticos inflamados en el cuello, axila e ingle, fatiga constante, dolor de garganta debido a amigdalitis), que acudieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, entre el período de mayo de 2007 y mayo de 2008. Algunos pacientes tenían previo diagnóstico de IgG positiva contra CMV. Todos estos individuos aceptaron participar firmando un consentimiento informado. Además de las muestras de los pacientes, se utilizaron en este estudio especímenes de individuos aparentemente sanos que sirvieron como controles negativos; individuos positivos por ELISA IgM y/o IgG a citomegalovirus (CMV), dengue y virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que se usaron para verificar la especificidad de la prueba ELISA utilizada en el presente estudio; y una muestra de un individuo EBV positivo por PCR suministrada por el laboratorio de diagnóstico molecular Genomik de Maracay, estado Aragua, usada como control positivo.

El trabajo se llevó a cabo tomando en cuenta las normas de bioética y bioseguridad establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki (Asamblea General Edimburgo, 2000). Las muestras de sangre completa (10 ml) fueron recolectadas por punción venosa a nivel del pliegue del codo con inyectadoras desechables, 5 ml fueron almacenadas en tubos plásticos con una gota de EDTA al 10,0%, y 5 ml en tubos secos, luego se centrifugó y se colocó el suero en un tubo limpio, ambas muestras fueron conservadas en congelación hasta el momento del procesamiento (Slockvower y Blumenfeld, 2000).

Determinación de Anticuerpos tipo IgM e IgG Contra EBV

La determinación de estos anticuerpos se realizó a través de la técnica de ensayo inmunoenzimático ELISA, en el cual, el antígeno purificado e inactivado del EBV, que se encuentra fijado a la fase sólida, se incubó con el suero humano diluido y las inmunoglobulinas específicas se adhieren al antígeno fijado a la fase sólida. Después, se procedió a lavar e incubar con el conjugado, el cual estuvo compuesto por un anti anticuerpo IgM humano monoclonal marcado con la enzima peroxidasa. Posteriormente, se eliminó el exceso de conjugado mediante lavado y se agregó el sustrato cromógeno sobre el cual actuó la enzima peroxidasa, originando un producto coloreado, el cual fue leído a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color fue proporcional a la concentración de los anticuerpos específicos presentes en la muestra.

Previo al ensayo, todos los reactivos se acondicionaron a temperatura ambiente (20 a 25°C), se tomó la placa donde se encontraban los pocillos para realizar el ensayo y se distribuyeron de la siguiente manera: un pozo para medir el valor del blanco del sustrato, cuatro pozos para cada uno de los diferentes calibradores y un pozo individual para cada muestra. Se utilizaron puntas desechables nuevas para dispensar los calibradores y las muestras.

La muestra de cada paciente se diluyó 1/21 y se agregó 100 µl en cada pozo, menos en el blanco, éstos se sellaron con cartulina autoadhesiva para evitar evaporación y se incubaron por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, los pozos se lavaron 3 veces con la solución de lavado y luego, se agregó 100 µl del conjugado diluido (1/50) en todos los pozos menos en el blanco y se incubó por 20 minutos a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación los pozos se lavaron 3 veces más, y se agregó 100 µl de cromógeno/sustrato (TMB/H₂O₂) a todos los pozos, la placa se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente protegiéndolos de la luz. Finalmente, se agregó 100 µl de solución de parada (H₂SO₄) en todos los pozos y se leyeron los valores de absorbancia a 450 nm en el lector de ELISA (Fotómetro Stat Fax 303 Plus).

El valor de referencia o punto de corte de anticuerpos IgM VCA, tomado para la determinación de esta prueba fue de $\geq 1,1$ UA/ml, los resultados mayor o igual a este valor se consideraron positivos (BioLine, 2009). La determinación de anticuerpos IgG anti VCA se realizó con la misma técnica que el método anterior, tomando el mismo valor de referencia o punto de corte (1,1 UA/ml), donde los resultados mayores o iguales a este valor se consideraron positivos (BioLine, 2009).

Extracción y Purificación del ADN

Para la extracción y purificación del ADN genómico de todas las muestras y controles obtenidos, se utilizó el kit de extracción de ADN genómico de Wizard (Promega), realizando el siguiente protocolo según las especificaciones del fabricante: se colocaron 300 μ l de sangre total en un tubo de centrifuga estéril de 1,5 ml, se realizó un lavado con 1 000 μ l de buffer fosfato (PBS a pH 7,4) y se centrifugó a 20 000 g en una centrifuga refrigerada marca Eppendorf modelo 5804R por 2 min a 18°C. Se descartó el sobrenadante y al sedimento se le agregó 1 000 μ l de PBS más 20 μ l de proteinasa K y se incubó por 2 horas a 55°C. Luego se centrifugó a 20 000 g por 2 min a 18°C, se descartó el sobrenadante, se agregó al sedimento 900 μ l de solución lisante de células y se incubó por 10 min a temperatura ambiente (invirtiendo 2-3 veces, una vez durante la incubación). Se centrifugó a 20 000 g por 2 min a 18°C, se descartó la mayor cantidad de sobrenadante sin mover el precipitado. Posteriormente, se mezcló vigorosamente en un vórtex marca Maxi Mix 1 durante 10-15 segundos, y se añadió 300 μ l de la solución lisante de núcleos en el tubo que contiene la resuspensión de células, mezclando bien por inversión del tubo. Seguidamente, se añadió 100 μ l de solución precipitante de proteínas y se mezcló vigorosamente en el vórtex durante 10-20 segundos, y luego se centrifugó a 20 000 g por 10 min a 18°C. Luego, fue removido cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio de centrifuga de 1,5 ml, conteniendo 300 μ l de isopropanol a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 20 000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y se añadió 300 μ l de etanol al 70,0% a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 20 000 g durante 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y dejó

secar. Finalmente, se añadió 100 µl de solución rehidratante y se incubó a temperatura ambiente toda la noche, guardándose el ADN a -20°C hasta su uso. Posteriormente, se realizó una corrida electroforética (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo) en gel de agarosa al 1,0%, coloreada con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml, usando un marcador de peso molecular de 1 kb para verificar la alta masa molar del ADN genómico.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica consiste en producir miles de copias de un fragmento de ADN blanco del virus, basándose en la capacidad que tiene la enzima ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* de sintetizar una cadena de ADN complementaria. Las secuencias de oligonucleótidos (Primers) que se usaron son los siguientes: QP1 (GCC GGT GTG TTC GTA TAT GG), QP2 (CAA AAC CTC AGC AAA TAT ATG AG) los cuales amplifican un fragmento de 213 pares de bases (pb) que corresponde al gen que codifica la proteína del antígeno nuclear uno del EBV (EBNA1) (Stevens y cols., 1999).

Tanto a las muestras como a los controles, se les realizaron las reacciones de amplificación en un volumen total de 25 µl, cuyas mezclas de reacción estuvieron compuestas por: 50 mmol/l de KCl, 1,5 mmol/l de MgCl₂, 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,5), 25 pmol de cada primer, 200 mmol/l de cada dNTP, y 1 U del ADN polimerasa GoTaq (Promega). Las muestras fueron corridas en un termociclador TECHNE (TC-512), utilizando el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos; 40 ciclos: desnaturalización a 95°C por un minuto, apareamiento de oligonucleótidos a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto; y finalmente un ciclo para asegurarse de producir fragmentos completos de doble cadena a 72°C por 10 minutos. Diez microlitros del producto de PCR de las muestras y controles amplificados fueron analizados por electroforesis (Sistema de electroforesis en gel EC330 Minicell Primo) en gel de agarosa al 2,0%, coloreado con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizado en un transluminador de luz ultravioleta. Para la corrida

electroforética se añadió un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega) para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Análisis Estadístico

Para el análisis comparativo de los resultados obtenidos de la técnica de PCR estandarizada con el diagnóstico de MI establecido a través de la prueba ELISA, se utilizó el índice de concordancia Kappa (Sokal y Rohlf, 1980). Para el cálculo de Kappa y de los análisis de regresión logística binaria se utilizó el programa SPSS versión 11,5.

RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron 86 pacientes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 2 y 60 años y sintomatología característica de MI. El diagnóstico serológico mostró la presencia de anticuerpos anti VCA del EBV, a través del método de ensayo inmunoenzimático ELISA, en 75 de 86 individuos, estableciéndose así 4 grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de anticuerpos IgM y/o IgG contra este virus (tabla 1): Grupo I IgM/ IgG positivas; Grupo II IgM positiva/IgG negativa; Grupo III IgM negativa/ IgG positiva; Grupo IV IgM/ IgG negativas.

En la tabla 1 se muestra la frecuencia de anticuerpos IgM e IgG anti VCA contra el EBV en los pacientes estudiados, a través del método inmunoenzimático ELISA, donde se encontró una frecuencia de 27,9% para los integrantes del grupo I, los cuales fueron positivos serológicamente por esta metodología diagnóstica a ambas inmunoglobulinas contra el virus, que junto con los individuos del grupo II (18,6%), sin embargo, la mayor frecuencia de pacientes se presentó en el grupo III (40,7%) resultando positivos a la IgG.

Tabla 1. Frecuencia de anticuerpos IgM y/o IgG anti VCA contra el EBV, a través del método inmunoenzimático ELISA, en individuos que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008

Grupos	n	%
I (IgM+/IgG+)	24	27,9
II (IgM+/IgG-)	16	18,6
III (IgM-/IgG+)	35	40,7
IV (IgM-/IgG-)	11	12,8
Total	86	100,0

n= número de pacientes, %= porcentaje.

Es importante señalar que, 32 de los pacientes en estudio también presentaban anticuerpos IgG contra CMV, donde la mayor frecuencia la presentaron los pacientes del grupo III, con un 59,3% seguido del grupo I con un 25,0%. Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de anticuerpos IgG anti EBV e IgG anti CMV, cuando se aplicó un análisis de regresión logística binaria ($p < 0,001$). Estimándose

que un paciente con anticuerpos IgG anti EBV tiene 20 veces mayor probabilidad de tener también IgG anti CMV, con respecto a los individuos que no están positivos a IgG anti EBV, según la razón de prevalencia (OR). La prueba de Kappa, con un valor de 0,628 demuestra una alta coincidencia de detección de estos anticuerpos para ambas infecciones (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de individuos positivos a IgG para citomegalovirus y la asociación estadística por la prueba de Kappa entre IgG anti CMV e IgM y/o IgG anti VCA para el EBV por el método inmunoenzimático ELISA, que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008

Grupos	IgG positiva para CMV		P-Kappa
	n	%	
I (IgM+/IgG+)	8	25,0	0,628
II (IgM+/IgG-)	2	6,3	
III (IgM-/IgG+)	19	59,3	
IV (IgM-/IgG-)	3	9,4	
Total	32	100,0	

n= número de pacientes, %= porcentaje.

En cuanto a la optimización del protocolo de extracción de ADN genómico para la detección viral, se observó una extracción satisfactoria del ADN de todas las muestras analizadas según el protocolo del kit de extracción de ADN genómico Wizard Genomic de Promega, obteniendo ADN de buena calidad y cantidad, lo cual es verificado en la figura 1 donde se aprecian las bandas correspondientes de 17 de las muestras experimentales.

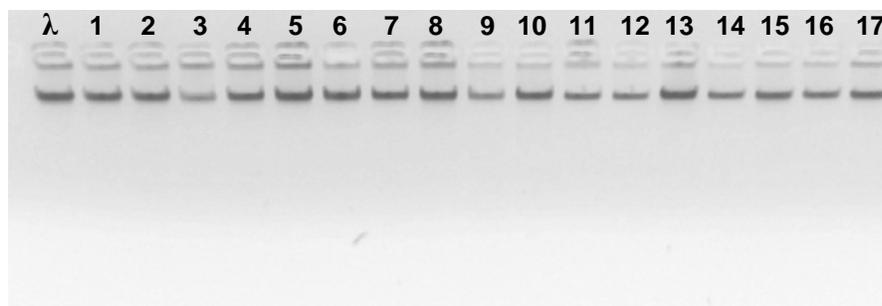


Figura 1. Bandas de ADN genómico de 17 muestras experimentales (pozos 1-17), corridas en gel de agarosa al 1,0% y coloreado con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml. λ: patrón de ADN del bacteriófago lambda con 200 ng.

Los individuos positivos a otros virus (CMV, Dengue y VIH) por el método ELISA, así como los individuos aparentemente sanos (CN) fueron negativos tanto para IgM como para IgG anti EBV, observándose lo contrario en el control positivo para EBV por PCR, la cual fue seropositiva, tanto para IgG como para IgM, contra EBV (tabla 3).

Tabla 3. Grupos controles utilizados para la estandarización de la técnica de PCR en relación con la prueba serológica para detectar anticuerpos IgM y/o IgG contra el EBV.

Grupos controles	N	EBV	
		IgM	IgG
Individuos aparentemente sanos (CN)	15	-	-
Individuo positivo para EBV por PCR*	1	+	+
Individuos positivos para CMV	12	-	-
Individuos positivos para Dengue	4	-	-
Individuos positivos para VIH	1	-	-

* Donado por el laboratorio Genomik, Maracay, estado Aragua, n= número de pacientes

La estandarización de la técnica de PCR, realizada según el protocolo descrito por Stevens y cols. (1999), resultó exitosa para la amplificación de un fragmento de 213 pares de bases (pb) que corresponde al gen que codifica el EBNA1.

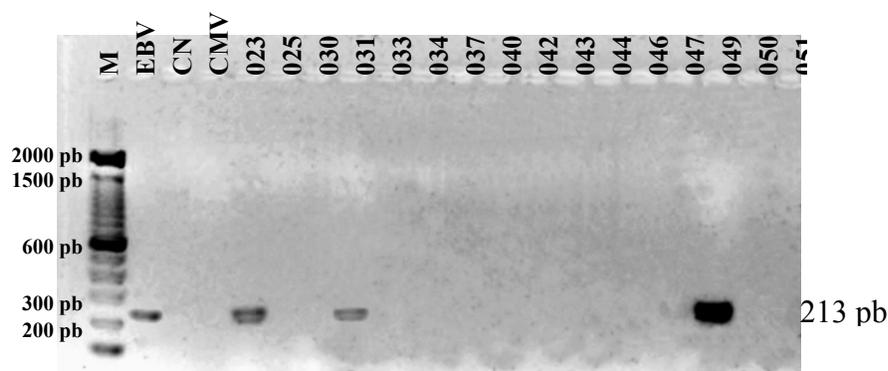


Figura 2. Detección del EBV en muestras de pacientes, mediante amplificación por PCR de un fragmento de 213 pb del gen que codifica para la proteína del antígeno nuclear 1 del EBV (EBNA1), corrido en gel de agarosa al 2,0% y coloreado con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), EBV: control positivo, CN: control negativo (agua), CMV: muestra positiva para CMV y muestras de los pacientes en estudio.

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación del EBV, se llevó a cabo la detección viral en las muestras experimentales, el control positivo y dos negativos (agua y CMV). En la figura 2, se muestra la amplificación del fragmento característico en el control positivo y en 3 de los pacientes analizados.

Se demuestra una marcada diferencia de frecuencias entre la detección del EBV por el método inmunoenzimático ELISA y por la técnica molecular, encontrándose un total de 8 pacientes positivos para EBV por esta última, distribuidos de la siguiente manera: 4 del grupo I (IgM e IgG positivos), 1 del grupo II (IgM positivo) y 3 del grupo III (IgG positivo), mostrando frecuencias de detección de 16,7%; 6,3% y 8,6% respectivamente (tabla 4), con el porcentaje más alto para el grupo I. Es de resaltar que en el grupo III, aunque sólo fueron positivos para IgG anti EBV, 3 de estos individuos se les detectó el ADN viral, lo que indica la presencia del EBV. Todos los pacientes que fueron negativos por la prueba serológica para EBV también mostraron negatividad al virus por PCR.

Tabla 4. Frecuencia de individuos con anticuerpos IgM y/o IgG anti VCA contra el EBV, con respecto a la detección por PCR del ADN, en individuos que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, 2008.

Grupos	ELISA EBV		PCR EBV	
	n	%	n	%
I (IgM+/IgG+)	24	27,6	4	16,7
II (IgM+/IgG-)	16	18,4	1	6,3
III (IgM-/IgG+)	35	40,2	3	8,6
IV (IgM-/IgG-)	11	13,8	0	0,0
Total	86	100,0	8	31,6

n= número de pacientes, %= porcentaje.

Al analizar la concordancia entre la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgM y/o IgG anti EBV con el diagnóstico molecular por PCR para detectar la presencia de ADN de EBV en la sangre, ésta fue muy baja, con valores de Kappa de 0,093 y 0,069, respectivamente.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, la mayor frecuencia de los pacientes evaluados mostraron anticuerpos IgG anti VCA contra el EBV (59/86; 68,6%). Resultado que es similar al reportado por Baute (2008), quien halló en un estudio, donde evaluó IgG e IgM anti VCA en 35 pacientes con VIH y en 50 sin VIH, que la presencia de la IgG anti VCA tenía una alta prevalencia (80,0%). Del mismo modo, Figueira y Pereira (2004) hallaron, al estudiar una población de 283 niños y adolescentes sanos entre 1 y 21 años de edad y de distintas condiciones socioeconómicas, en Vitória, Brasil, un elevado porcentaje de detección (71,0%) de este anticuerpo. En este sentido, se ha informado que el EBV se halla infectando al 90,0% de la población, con tendencia a la cronicidad, frecuentemente con un curso asintomático; además, que el anticuerpo IgG anti VCA del EBV puede persistir en bajos niveles en personas aparentemente sanas durante toda la vida (Straus y cols., 1993), lo que podría explicar la alta frecuencia de este anticuerpo hallada en el presente estudio.

Por su parte, Marrero y cols. (1992) en Cuba, encontraron más del 90,0% de prevalencia de anticuerpos IgG contra EBV en 100 individuos sanos y un 100,0% en un grupo de 100 pacientes con sintomatología sugestiva de MI. Rea y cols. (2002) señalan, que en la infancia las infecciones primarias de MI suelen ser en su mayor parte asintomáticas, y durante la adolescencia generalmente se presentan con el cuadro clínico característico de la infección, siendo probablemente la respuesta inmunológica la responsable de la mayoría de las manifestaciones clínicas presentadas en la infección aguda por este virus.

Con respecto a los resultados de la frecuencia de la IgM anti VCA, difieren de los reportados por Hannaoui y cols. (2005), quienes en la ciudad de Cumaná, con 150 pacientes VIH positivos que presentaban clínica sugestiva de MI, obtuvieron una frecuencia del 12,0% para este anticuerpo, mientras que en este trabajo de investigación, los individuos con IgM positiva (grupo I y II) fueron más frecuentes (46,5%).

En este estudio todos los pacientes seropositivos fueron sintomáticos, tanto los que presentaron IgG (40,7%) como los que mostraron IgG e IgM contra VCA (27,9%) y los que sólo presentaron IgM anti EBV (18,6%), en estos casos se hace necesario investigar otros marcadores serológicos como AH, anticuerpos anti EBNA1 o anti EA para establecer la fase de la infección (Mendoza y Rojas, 2009).

Un título alto de los anticuerpos IgG anti VCA, junto con la positividad de los anticuerpos anti-EA y la ausencia (o títulos bajos) de los anticuerpos IgM anti-EBNA, puede ser igualmente indicativo de una infección aguda por el EBV. Un patrón de infección pasada estaría definido por la presencia de anticuerpos IgG anti VCA e IgG anti-EBNA, junto con la ausencia de AH y de anticuerpos específicos del tipo IgM anti VCA (Mendoza y Rojas, 2009).

Chacón y cols. (2008) estudiaron la presencia de IgM e IgG anti VCA y anti EBNA1 por el método ELISA y la cuantificación de EBV en sangre periférica por PCR en 21 niños con diagnóstico positivo para el VIH, encontrando que, del total de niños evaluados, 7 (33,3%) fueron identificados como portadores de infección por EBV: 2 (9,5%) de estos, positivos para IgM anti VCA e IgM anti EBNA1, ubicados por lo tanto dentro de la fase aguda del proceso y 5 (23,8%) con ausencia de IgM anti VCA y presencia de IgM anti EBNA1, que corresponden a la fase tardía de la MI; todos presentaron cargas virales detectables para el EBV, los 14 pacientes restantes presentaron IgM anti VCA negativa, IgG anti VCA e IgG anti EBNA1 positivas interpretándose como infección pasada, de los cuales 11 (78,6%) presentaron cargas virales detectables para EBV.

Gross (2001) indica que las inmunoglobulinas IgM anti VCA aparecen de 3 a 6 días después del inicio de los síntomas y que las IgG anti VCA aparecen casi simultáneamente a la de las IgM anti VCA y anti EA. La detección de anticuerpos específicos IgG anti VCA son indicio de que el virus se encuentra infectando las células blancas del huésped, pero no permiten identificar enfermedad activa en el individuo; ya

que estos se encuentran tanto en fase aguda como latente. Los anticuerpos IgG anti VCA se encuentran con un título máximo entre 2-4 semanas post-infección para declinar a valores más bajos durante la convalecencia, los cuales persisten indefinidamente.

En esta investigación se encontró un 12,8% (n=11) de pacientes donde no se detectó la presencia de los anticuerpos IgM e IgG contra VCA de EBV, probablemente estos pudieron estar infectados por cualquier otro agente causal de síndrome mononucleósido, ó pudiese estar ocurriendo lo planteado por Mendoza y Rojas, 2009, quienes han informado que, aunque existe un patrón de respuesta inmune habitual a la presencia del EBV, hay que tener en cuenta que los anticuerpos IgM frente al VCA pueden estar ausentes en la infección primaria.

De los pacientes del estudio que presentaron IgG positivos para CMV, la mayor frecuencia fue encontrada en el grupo III (IgM negativa/ IgG anti VCA positivos para EBV). En consecuencia, el análisis de regresión logística binaria reportó una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,001$) entre la presencia de anticuerpos IgG anti EBV e IgG anti CMV.

En Venezuela, Chacón y cols. (2002), al realizar un estudio cuyo objetivo consistió en determinar la prevalencia de IgG anti EBV e IgG anti CMV en una población menor de 25 años, sana del estado Carabobo, reportaron una seropositividad de la IgG de 83,3% y 93,3% para estos virus, respectivamente, entre la población mayor de 16 años.

Costa y cols. (2004), al estudiar 36 pacientes infectados por el VIH, señalan que el 83,3% presentaron anticuerpos IgG anti CMV y el 47,2% de los individuos sanos presentaron anticuerpos IgG anti VCA. Se ha planteado que el CMV, como el EBV, también es un herpesvirus y, al igual que los otros virus de esta familia, tiene la particularidad de producir infección latente y reactivarse por factores dependientes del huésped (Losa y cols., 1998; López, 2009).

Fica (2003), sostiene que la determinación de anticuerpos IgM anti VCA para el diagnóstico de MI por EBV presenta un inconveniente, ya que puede resultar positivo para los enfermos con CMV. Para comprobar dicha situación es necesario investigar las reacciones cruzadas del método serológico empleado en la detección del mencionado anticuerpo, usando sueros positivos sólo para CMV, lo cual no fue un objetivo de este estudio. Se ha planteado reacciones cruzadas de la prueba ELISA en la determinación de EBV, se debe a las características antigénicas de ambos virus. En este sentido, se ha observado reactividad de IgM muy específica tanto con elementos repetitivos, ricos en glicina-alanina (Gly-Ala) contenidas en el antígeno nuclear 1 (EBNA-1) del EBV, como también en sueros de pacientes con infección aguda por CMV (Rhodes y cols. 1990). Lang y cols. (2001) demostraron que la infección primaria con EBV lleva a la síntesis de anticuerpos del tipo IgM que reaccionan con fragmentos antigénicos de pUL44 y pUL57 del CMV, e identificaron los dominios ricos en glicina de estas proteínas como blancos de IgM inducida por EBV. Estos anticuerpos muestran la misma cinética de reactividad como IgM dirigida contra repeticiones Gly-Ala. Ello sugiere por consiguiente, que durante la infección de EBV los anticuerpos IgM inducidos reaccionan con el grupo N-terminal del EBNA-1 así como con pUL44 y pUL57 de CMV.

Dada la posible confusión de mononucleosis infecciosa por EBV desde el punto de vista clínico, con enfermedades hematológicas y otros patógenos, es esencial utilizar para su diagnóstico una prueba de alta sensibilidad y especificidad como la PCR, por ser rápida, fiable y de realización prácticamente individualizada (Corvalán y cols., 2003).

Siennicka y Trzcinska (2007), al evaluar la utilidad del ELISA y del diagnóstico molecular por PCR, encuentran que, basándose en los resultados de anticuerpos específicos IgM por la prueba ELISA, 10,7% de las muestras estudiadas se clasificaron como infección primaria por EBV, 20,1% fueron seronegativos, 7,4% se clasificó como la reactivación de infecciones latentes, el 45,6% de los pacientes señalaron infección pasada por EBV, mientras que la PCR arrojó un 11,2% de resultados positivos del total de las muestras diagnosticadas por ELISA y solo un 15,0% de los pacientes con

infección primaria, detectados por la misma prueba serológica, fueron positivos por PCR; lo cual coincide con la presente investigación donde se obtuvo mayor frecuencia de positivos por el método serológico. La concordancia entre la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos IgM o IgG anti VCA del EBV con el diagnóstico molecular por PCR para detectar la presencia de ADN de mismo virus en la sangre, fue muy baja en este estudio, con valores de Kappa de 0,093 y 0,069, respectivamente.

Siennicka y Trzcinska (2007) sugieren que las muestras más adecuadas para el método de PCR son: sangre completa, secciones de tejido o células de hisopados, y que la investigación de IgM específica en una muestra única de sangre, tomada durante la fase aguda de la enfermedad, permite realizar una buena identificación de esta inmunoglobulina. En este estudio las muestras fueron tomadas cuando los pacientes presentaron síntomas sugestivos de MI, sin embargo no se pudo definir con exactitud el tiempo del inicio o culminación de dichos síntomas.

Por su parte, Mate y cols. (2009) reportaron la amplificación de zonas conservadas del genoma del EBV para detectar la infección vírica en diversas muestras clínicas, tales como tejidos, sangre, saliva, etc. Esto ha sido empleado desde hace algún tiempo para relacionar esta infección con diversas situaciones clínicas. Sin embargo, se ha observado la presencia de ADN del EBV en linfocitos de individuos sanos, por lo que la detección cualitativa del virus en sangre no permite distinguir entre infección crónica y reactivación.

En el presente estudio, la PCR detectó ADN del EBV en sólo 5 de los 40 pacientes positivos para IgM anti VCA (grupo I y II). Lo que difiere de los resultados obtenidos por Bauer y cols. (2005), quienes investigaron la utilidad diagnóstica de la PCR cuantitativa en tiempo real para detectar y cuantificar EBV en el suero de 98 pacientes inmunocompetentes, con edades de 1-47 años, sintomáticos, con detección previa de anticuerpos IgM anti VCA del EBV, indicativo de infección primaria, hallando que 93 de 98 muestras fueron positivas, con una sensibilidad del 94,9% y una especificidad de

97,4% para la infección primaria por EBV. El ADN del EBV fue detectable hasta 12 días después de la aparición de los síntomas, mientras que no se halló positividad de la PCR después de un período de 22 días posterior al inicio de la enfermedad. La detección del ADN del EBV mostró clara asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Estos resultados indican que la PCR en tiempo real es una herramienta fiable para el diagnóstico de la infección primaria por EBV en las primeras etapas de la enfermedad. En el presente estudio, todos los pacientes (n=8) que resultaron positivos por PCR mostraron síntomas sugestivos de MI, lo que indica que la mencionada técnica es útil para el diagnóstico de EBV en presencia de síntomas de la enfermedad.

Probablemente, en este estudio la baja frecuencia en la detección de EBV por PCR (31,6%), se debió a disminución de la carga viral en el momento en que fueron obtenidas las muestras de sangre, ya que se desconoce el día exacto del curso de la infección. En este sentido, Fafi y cols. (2005) al investigar la carga viral del EBV en las células mononucleares de sangre periférica, plasma y saliva, así como la infectividad del virus en la saliva, en 20 pacientes durante 6 meses después del inicio de la mononucleosis infecciosa (MI), demuestran altas cargas de ADN de EBV en la saliva e infectividad asociada a una persistencia del virus en la saliva en el día 180, mientras que, en sangre periférica la carga viral en células mononucleares disminuyó significativamente desde el día 0 al 180, y a pesar de una reactivación viral entre el día 30 y 90, en el 90,0% de los pacientes, el ADN del EBV desapareció rápidamente del plasma.

Otro factor que pudo afectar los resultados de esta investigación fueron los cebadores utilizados en la amplificación. Ambinder y cols. (1990) evaluaron los oligonucleótidos usados en la amplificación del gen que codifica para el EBNA-1, en líneas celulares de laboratorio infectadas con el EBV y en muestras de sangre de pacientes seropositivos al virus. Hallaron ADN del EBV en las líneas celulares previamente infectadas con dicho virus. No reportaron falsos positivos al evaluar los oligonucleótidos en líneas celulares infectadas con otros virus. Sin embargo, estos autores encontraron ADN del EBV en sólo 3 de 18 individuos serológicamente

positivos, lo que concuerda con los resultados del presente estudio. Ellos concluyeron que la PCR, con los oligonucleótidos utilizados, fue altamente sensible en la detección de EBV cuando usaron muestras de pacientes con linfomas asociados al EBV.

Zambrano y cols. (2006) evaluaron la importancia diagnóstica de la PCR usando líquido cefalorraquídeo para la detección de agentes infecciosos del sistema nervioso central en pacientes de Maracay, reportando la utilidad de la técnica para detectar bacterias de difícil diagnóstico y Herpesvirus, entre ellos el EBV y el CMV. Estos investigadores concluyeron que la utilización de la biología molecular representa una alternativa de elección para el sistema de salud nacional permitiendo perfeccionar el diagnóstico y los estudios epidemiológicos de las infecciones del SNC de etiología no bacteriana.

En los resultados de este estudio se muestra que ambas técnicas (ELISA y PCR) coincidieron en los reportes negativos al virus, donde los individuos que se encontraron seronegativos para EBV tampoco mostraron ADN, lo que indica ausencia de infección por EBV y la probable infección por otros agentes. Se ha informado que el CMV humano reporta una alta prevalencia de seropositividad poblacional entre 80,0 y 100,0% en los países subdesarrollados (Landolfo y cols., 2003; Arellano y cols., 2009), por lo que podría ser uno de los agentes causantes de síntomas de MI en estos individuos.

Una de las limitaciones de este estudio fue que no se determinó con exactitud la etapa de la infección que presentaban los pacientes, para ello también se debió determinar los anticuerpos anti EBNA, los anti AE y los AH, que permitirían identificar las diferentes fases de la infección en los pacientes evaluados (Mendoza y Rojas, 2009).

En esta investigación, la PCR no sólo detectó ADN del EBV en pacientes que se hallaban en etapa aguda de la infección (grupo I y II), sino también en individuos del grupo III que eran positivos sólo a IgG, lo que implica que la detección de ADN del EBV en pacientes con IgG anti VCA positiva y presencia de síntomas podría estar

asociado a reactivación de la infección (Haque y cols., 1997). Okay y cols. (2005), con el objetivo de verificar si la detección por PCR del ADN de EBV estaría relacionada a reactivación de la infección, le hicieron seguimiento, mediante amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína gp220 del virus a 24 muestras de sangre completa, y sus respectivos sueros, de un paciente inmunosuprimido debido a trasplante cardíaco, durante 36 meses. Antes del estudio el paciente presento IgG e IgM anti VCA positivas e IgG anti EBNA negativa con lo que se le diagnosticó MI. Catorce meses después se halló IgG anti VCA e IgG anti EBNA positiva, IgM anti VCA negativa y ADN del virus en todas las 24 muestras de sangre completa y en sólo 12 de las muestras de suero. Por lo que concluyeron que la detección de ADN del EBV en muestras de suero de pacientes inmunosuprimidos, mediante PCR convencional con detección límite de 100 copias por μg de genoma, podría ser usada como marcador de actividad de la infección cuando las técnicas cuantitativas de amplificación no fuesen factibles.

Para incrementar la especificidad en la detección del EBV sería interesante aplicar la PCR de doble ronda o Nested PCR. Este sistema de PCR se ha usado para detectar el gen que codifica la proteína de membrana latente (LMP-1) del EBV, detectando tanto a B95 prototipo-8 como a AG876 de las cepas tipo 1 y tipo 2 del virus, respectivamente. Este método es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que se usan dos pares (en lugar de un par) de cebadores de PCR para amplificar un fragmento, ofreciendo la ventaja de amplificar dos veces un blanco genómico, lo que incrementa las posibilidades de detectar el agente patógeno en estudio (Kieff y Rickinson, 2001).

A pesar de los inconvenientes que presenta el uso de la PCR, que resulta un método costoso y laborioso, el uso de esta técnica se hace importante en los casos donde, debido a la variabilidad de respuesta inmune de algunos individuos, no se logra distinguir, mediante estudios serológicos, un proceso de reactivación. Es así como, los avances en el perfeccionamiento de la PCR se ha planteado como una alternativa para detectar antigenemia, así como también la PCR-cuantitativa para determinar la carga viral y predecir una reactivación.

CONCLUSIONES

La mayor frecuencia de los pacientes evaluados presentaron anticuerpos anti VCA del virus de Epstein-Barr, encontrándose predominio los del tipo IgG (grupo I/III).

La mayor frecuencia de los individuos con anticuerpos IgG anti VCA para EBV, también presentaron IgG anti CMV, lo que demuestra una asociación significativa entre ambas infecciones; ello permite presumir que en estos pacientes ambos virus pueden hallarse en fase latente o crónica provocando co-infecciones, sin embargo serian necesarios otros marcadores serológicos y otras pruebas diagnósticas para descartar la presencia de reacciones cruzadas entre ellos.

La PCR permitió identificar de manera específica el genoma de Epstein-Barr como agente causante de la mononucleosis infecciosa.

No se halló concordancia entre la PCR para EBV y las pruebas serológica IgM e IgG anti VCA. La PCR de ronda simple pudiera no tener suficiente sensibilidad para la detección del 100,0% de los casos de infecciones activas, latentes o crónicas causadas por EBV.

RECOMENDACIONES

La PCR se debe considerar como prueba complementaria a la determinación serológica, ya que esta última provee una relación detallada de la evolución de la enfermedad.

Aplicar la técnica de Nested PCR para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico del EBV. Además, se debe evaluar los diferentes tipos de anticuerpos anti EBV y sus títulos, respecto a la carga viral en trabajos posteriores, para un mejor seguimiento de la infección.

En futuras investigaciones se podría incrementar el número de variables cuantitativas (anticuerpos heterófilos, anticuerpos anti EBNA, anti EA) para correlacionarlas con variables clínico-epidemiológicas.

BIBLIOGRAFÍA

Alfieri, C.; Rousseau, E. y Tanner, J. 2000. Chronic-active Epstein-Barr virus infection. *J. IHMF.*, 5(1): 12-14.

Ambinder, R.; Lambe, B.; Mann, R.; Hayward, S.; Zehnbauer, B.; Charache, P. 1990. Oligonucleótidos para la amplificación de la reacción en cadena de polimerasa y la detección de la hibridación de ADN del virus de Epstein-Barr en muestras clínicas. *Mol. Cell. Probes*, 4(5):397-407.

Arellano, J.; Jiménez, E.; Velásquez, N.; Montaña, E.; Moreno, M.; Bello, A. y Vázquez, E. 2009. Frecuencia de infección activa por citomegalovirus en pacientes pediátricos en estado crítico e inmunodeprimidos. *Patología*, 47(3): 198-203.

Asamblea General Edimburgo, 2000. Declaración de Helsinki de la asociación médica mundial. Principios éticos para las investigaciones en seres humanos. Escocia.

Bauer, C.; Aberle, S.; Popow, T.; Kapitan, M.; Hofmann, H. y Puchhammer, E. 2005. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. *J. Med. Virol.*, 75(1): 54-8.

Baute, M. 2008. Determinación de anticuerpos contra el virus Epstein Barr (VEB) en pacientes con VIH/SIDA positivos que asisten al Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA). Cumaná-Estado Sucre. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Núcleo Sucre.

BioLine, 2009. Determinación de anticuerpos IgM e IgG frente a antígeno de cápside viral del virus Epstein-Barr (EBV-VCA IgM) mediante el método ELISA. USA. Número 337.

Chacón, M.; Naveda, O.; Castillo, O.; Flores, M.; Casanova, L.; Castro, L. y Naveda, M. 2002. Prevalencia de anticuerpos anti-citomegalovirus y anti-virus Epstein Barr en Valencia, Estado Carabobo, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 22(2): 131-135.

Chacón, M.; Castillo, O.; Flores, M.; Casanova, L.; Castro, L.; Sánchez, M. 2008. Infección por virus Epstein Barr en niños VIH positivos: Relación con carga viral del VIH y contaje de linfocitos T CD4+. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 28: 121-126.

Cohen, J. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 343: 481-92.

Comach, G.; Camacho, E.; Álvarez, M.; Soler, M.; Chiarello, A. y Quintana, M.

1998. Diagnóstico de laboratorio del dengue mediante las técnicas de aislamiento viral y la reversa transcripción reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Manual. Facultad de Ciencias. Universidad de Carabobo. Maracay.

Corvalán, A.; Aguayo, F.; Lévicán, J. y Corvalán, I. 2003. Biología molecular en infectología. *Rev. Chil. Infectol.*, 20(1): 26-38.

Costa, L.; Araujo, M.; Castillo, C.; Nayghit, y.; Callejas, A.; Porto, D.; Atencio, M.; Monsalve, L.; García, F.; Carruyo, L.; Sánchez, G.; Sánchez, H. y Mavárez, A. 2004. Coinfección Epstein Barr (EBV) Citomegalovirus (CMV) y Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH) en pacientes atendidos en el laboratorio regional de referencia virológica. Maracaibo-estado Zulia-Venezuela. 1998-2004. <<http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeintidos/Congreso/ArchivosHTML/Codigo10.htm>> “Google” (21/07/10).

Crespo, M. 2000. El diagnóstico viral por el laboratorio. *Rev. Colom. Med.*, 31(3): 135-150.

Crespo, M. y Paniagua, M. 2009. Epidemiología de la infección por virus de Epstein-Barr en el trasplante cardíaco. Tratamiento y prevención. Servicio de Cardiología Hospital Juan Canalejo, A Coruña. <<http://www.rochetrasplantes.com/web/atos/pdf/document27.pdf>> “Google” (08/11/09).

Dewhurst, S. 1999. Introducción a la Virología. <<http://www.urmc.rochester.edu/smd/mbi/grad2/herp99B.html>> “Google” (09/1109).

Fafi, S.; Morand, P.; Brion, J.; Pavese, P.; Baccard, M.; Germi, R.; Genoulaz, O.; Nicod, S.; Jolivet, M.; Ruigrok, R.; Stahl, J. y Seigneurin, J. 2005. Excreción prolongada del virus de Epstein-Barr infecciosas después de la mononucleosis infecciosa. *J. Infect. Dis.*, 191(6): 985-9.

Fica, A. 2003. Síndrome de mononucleosis infecciosa en pacientes adolescentes y adultos. *Rev. Chil. Infectol.*, 20(4): 235-242.

Figueira, C. y Pereira, F. 2004. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 37(5): 409-412.

Gimeno, C.; Navarro, D.; De Oña, M. y Pérez, J. 2005. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Herpesvirus. *Proced. Microbiol. Clín.*, 24(8): 8-21.

Gross, T. 2001. Treatment of Epstein Barr virus infection. *Dermatol. Clin.*, 20: 283-389.

Guzmán, A. 2006. Diagnóstico serológico de la mononucleosis infecciosa por el virus Epstein Barr y Citomegalovirus a través de la prueba de aglutinación en látex (Monotest) y dos ensayos inmunoenzimáticos distintos. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná.

Hannaoui, E.; Sulbarán, M. y Campos, M. 2005. Características clínicas y parámetros hematológicos de pacientes con fiebre dengue y mononucleosis infecciosa. *Kasmera*, 33(2): 93-101.

Haque, T.; Tomás, J.; Parra, R.; Hunt, B.; Yacoub, M. y Crawford, D. 1997. Prospective study in heart and lung transplant recipients correlating persistent Epstein-Barr virus infection with clinical events. *Transplantation*, 64: 1028-1034.

Hubert, N.; Van Esser, J.; Fries, E.; Wolthers, K.; Cornelissen, J. y Osterhaus, A. 2000. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 712-715.

Kieff, E. y Rickinson, A. 2001. Virus de Epstein-Barr y su replicación. Philadelphia, Pennsylvania. Págs. 2511-2573.

Landolfo, S.; Gariglio, M.; Gribaudo, G. y Lembo, D. 2003. The human Cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.*, 98: 2667-2669.

Lang, D.; Vornhagen, R.; Rothe, M.; Hinderer, W†, Sonneborn, H. y Plachter, B. 2001. Cross-reactivity of Epstein-Barr Virus-specific immunoglobulin M antibodies with Cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(4): 747-756.

López, A.; Llorente, J.; Melón, S.; García, J.; García, D. y Suárez, C. 2003. Detección del virus herpes simplex y del virus de epstein-barr en los carcinomas de células escamosas de vías aerodigestivas superiores. *Act. Otorrinolaringol. Esp.*, 54: 506-511.

López, T. 2009. Síndrome mononucleósido, mononucleosis infecciosa y diagnósticos diferenciales. Clínica de enfermedades infecciosas. Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay. <<http://www.infecto.edu.uy/espanol/revisiointemas/tema6/mononucleosis.html>>“Google” (07/11/09).

Losa, J.; Miró, J. y García, F. 1998. Síndrome mononucleósico. *Medicine*, 7(82): 3813-3817.

Marrero M.; Álvarez M.; Suárez L.; Díaz-Jidi M. y Kourí V. 1992. Estudio de la respuesta serológica a algunos herpesvirus en un grupo de pacientes infectados por el VIH. *Rev. Cubana. Med. Trop.* 44(3):208-211.

Mate, J.; Navarro, J.; Hernández, Á. y Ausina, V. 2009. Síndromes linfoproliferativos asociados al virus de Epstein-Barr. Control de Calidad SEIMC. <http://www.seimc.org/control/revi_Sero/VEBslinfo.htm> “Google” (11/11/09).

McIntosh, K. 1996. Diagnostic virology. In Knipe TM, Fields BN, Howley PM (eds.). Virology. 3ra ed. Philadelphia: Lippincott Raven.

Méndez, S. y Pérez, E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22(3):183-92.

Mendoza, J. y Rojas, A. 2009. Diagnóstico serológico de la infección por el virus de Epstein-Barr. Departamento de Investigación y Desarrollo. Vircell S.L. Granada. <http://www.seimc.org/control/revi_seropdf/ebvrev.pdf> “Google” (09/11/09).

Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262(4): 56-64.

Navarro, D. 2000. Diagnóstico de la mononucleosis infecciosa causado por el virus de Epstein Barr. *Boletín de control de calidad*, 12(2): 22-29.

Pagano, J. 2002. Viruses and lymphomas. *New Engl. J. Med.*, 347: 78-9.

Pérez, J.; Oña, M.; Gimeno, C. y Mendoza, J. 1995. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus. <<http://www.seimc.org/protocolos/microbiología/cap8.htm>> “Google” (22/06/2005).

Okay, T.; Del Negro, G.; Yamamoto, L. y Raiz, R. 2005. Detection of EBV-DNA in serum samples of an immunosuppressed child during a three years follow-up: association of clinical and PCR data with active infection. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 47(2):99-102.

Rea, T.; Russo J.; Katon W.; Ashley R. y Buchwald D. 2002. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J. Am. Board. Fam. Pract.*, 14(4): 234–242.

Rhodes, G.; Smith, R.; Rubin, R.; Vaughan, J. y Horwitz, C. 1990. Identical IgM antibodies recognizing a glycine-alanine epitope are induced during acute infection with Epstein-Barr virus and cytomegalovirus. *J. Clin. Lab. Anal.*, 4: 456-464.

Rodríguez, M. 2005. Incidencia, Prevalencia y seroconversión de anticuerpos contra el virus Epstein-Barr en pacientes que acuden al Laboratorio Clínico Universitario Rental Sucre, Cumaná, estado Sucre. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente, Cumaná.

Satz, M. y Kornblihtt, A. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia*

Hoy, 4(23): 26-35.

Siennicka, J. y Trzcinska, A. 2007. Laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 59(3): 259-66.

Slockvower, J. y Blumenfeld, T. 2000. Toma de muestra para análisis clínico. Guía Práctica. Editorial Labor, S.A Madrid, España.

Sokal, R. y Rohlf, F. 1980. *Biometry*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A.

Stevens, S.; Vervoort, M.; Burle, A.; Meenhorst, P.; Meijer, C. y Middeldorp, J. 1999. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 37(9): 2852-2857.

Straus, S.; Cohen, J.; Tosato, G. y Meier, J. 1993. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann. Intern. Med.*, 118: 45-58.

Ternak, G. y Szucs, U. 1997. Los signos serológicos del virus de Epstein-Barr (VEB), la actividad en los ancianos. *Act. Microbiol. Immunol. Hungarica*. 44:133-140.

Vera, D.; Chávez, N.; Cervera, J. y Méndez, N. 2003. Mononucleosis infecciosa. *Med. Sur.*, 10(2): 76-89.

Young, L. y Murray, P. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22: 5108-5121.

Zambrano, Y.; Chiarello, A.; Soca, A.; Villalobos, I.; Marrero, M.; Soler, M.; Laferte, J. y Álvarez, M. 2006. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central. *Invest. Clin.*, 47(4): 337-347.

ANEXO

ANEXO 1

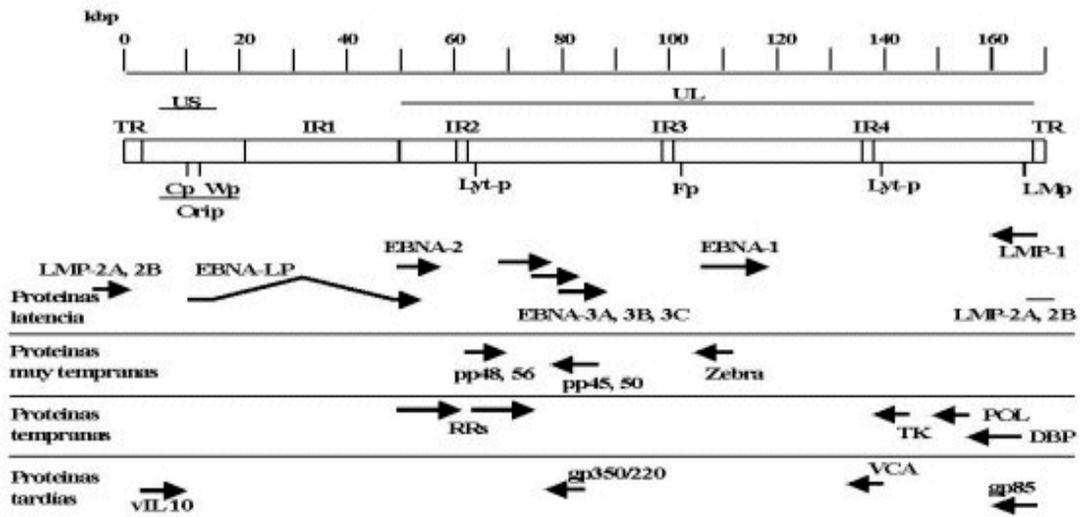


Figura 3. Esquema del Genoma del virus del VEB

APÉNDICE

Apéndice 1

CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación del Dr. Marcos De Donato, se está realizando el proyecto de investigación titulado **“EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA CAUSADA POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR”**. Cuyo objetivo general es evaluar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa causada por el virus Epstein- Barr.

Yo: _____

C.I: _____ Nacionalidad: _____

Estado Civil: _____ Domiciliado en: _____

A través de la presente declaro que, siendo mayor de edad, en pleno uso de mis facultades y sin obligación alguna, estoy en completo conocimiento de la naturaleza, duración y riesgos relacionados con el estudio indicado, por lo que reconozco:

1. Haber sido informado (a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este Proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado: **“EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA CAUSADA POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR”**.
2. Tener conocimiento claro de que el objetivo del trabajo antes señalado es evaluar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa causada por el virus Epstein- Barr.
3. Conocer bien el Protocolo Experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación en este trabajo consiste en: donar de manera voluntaria una muestra de sangre mediante punción venosa, previa asepsia de la región anterior del antebrazo.
4. Que la muestra que acepto donar se utilizara única y exclusivamente para determinar los niveles de hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos.

5. Que el personal que realiza esta investigación, me ha garantizado confiabilidad relacionada tanto a mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos para presente estudio.
7. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgos e inconveniente alguno para mi salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga en relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo de personas antes mencionadas.
9. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido Proyecto de Investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto a mi participación en este estudio es totalmente voluntaria, acuerdo:

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en las muestras que acepto donar para fines indicados anteriormente.
2. Reservarme el derecho de renovar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencias negativa para mi persona.

Firma de voluntario: _____

Nombres y apellidos: _____

C.I: _____

Lugar: _____

Fecha: _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación de este estudio. Ningún problema de índole médica de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Por el Proyecto,

Nombre: Risela L. Morales H.

Lugar y Fecha: Cumaná 14 de junio de 2008.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA CAUSADA POR EL VIRUS EPSTEIN-BARR
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
MORALES HURTADO, RISELA LUISANA	CVLAC	16.808.346
	e-mail	Risela84@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Epstein-Barr
Reacción en cadena de la polimerasa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	Bioanálisis

Resumen (abstract):

La mononucleosis infecciosa (MI) es una enfermedad causada más frecuentemente por el virus Epstein-Barr (EBV), con sintomatología y serología inespecífica que dificulta la identificación del agente causal. Con el propósito de optimizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de MI causada por el virus Epstein-Barr, se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos IgM e IgG contra el antígeno de la cápside viral (VCA), mediante el método ELISA, y el ADN del virus mediante la técnica de PCR, en 86 pacientes de sexo masculino y femenino, con edades comprendidas entre 2 y 60 años, con sintomatología sugestiva de MI, que asistieron a Oriental de Salud Integral C.A. de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, entre el período de mayo de 2007 y mayo de 2008. También se analizaron, por PCR, controles positivos y negativos al EBV, así como seropositivos a otros agentes infecciosos como el CMV, virus del dengue y VIH, por el método ELISA. Del total de individuos evaluados, la mayor frecuencia (75/86; 87,2%) resultó positivo para anticuerpos anti EBV. En el total de seropositivos, se halló una prevalencia para la IgG anti VCA del 40,7%, mientras que la IgM anti VCA mostró un porcentaje menor (18,6%) y un 27,9% de los individuos presentó tanto IgG como IgM anti VCA. En 32 pacientes también se encontró la presencia de IgG para CMV, donde la mayor frecuencia (59,3%) coincidió de forma significativa con la presencia de IgG anti VCA contra el EBV. La PCR evaluada confirmó el control positivo para EBV donado por un laboratorio externo. La misma logró detectar ADN del EBV en 8 de los pacientes seropositivos, de los cuales 4 mostraron anticuerpos IgM e IgG anti VCA, 1 presentó sólo IgM anti VCA y 3 exhibieron sólo IgG anti VCA. Los individuos seronegativos al EBV también se hallaron negativos a este virus mediante la PCR.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marcos De Donato	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	marcosdedonato@yahoo.com
	e-mail	
María Zulay Sulbarán	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Yoleida Rodríguez	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2010	10	29

Lenguaje: Español

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_RLMH.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: Universal

Temporal: Intemporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIATURA

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de difundir por cualquier medio el resumen de este trabajo de investigación. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales y comerciales.

Risela L. Morales H.



Asesor
Prof. Marcos De Donato



Jurado
María Zulay Sulbarán



Jurado
Yoleida Rodríguez

POR LA COMISIÓN DE TESIS

