

ARTÍCULO ORIGINAL

Expresión atípica en la detección y cuantificación del virus de Epstein-Barr utilizando PCR en tiempo real

Atypic expression in the detection and quantification of Epstein-Barr virus using real-time PCR

Israel Parra-Ortega, Briceida López-Martínez, José Luis Sánchez-Huerta, Armando Vilchis-Ordóñez, Leticia Barrera Dávila

Resumen

Introducción. La carga viral del virus de Epstein-Barr (VEB) no solamente sirve para detectar una infección activa, sino también como marcador tumoral de ciertas formas malignas. En los pacientes inmunocomprometidos está relacionado con el síndrome linfoproliferativo postrasplante (SLPT) y la incidencia se encuentra en el orden de 1 a 20%. Se recomienda la determinación de la carga viral del VEB en sangre total y plasma para dar seguimiento a los pacientes en riesgo de padecer el SLPT; para esto, se utiliza como herramienta la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR). El objetivo de este trabajo es describir los hallazgos de las variaciones identificadas en el genoma del VEB al realizar la detección y cuantificación en muestras de pacientes pediátricos, utilizando la tecnología de PCR-TR.

Métodos. Se analizaron retrospectivamente los resultados de 352 pacientes pediátricos a los que se les había realizado la detección y cuantificación del VEB en sangre periférica y plasma por medio de PCR-TR. Se amplificó un fragmento de 166 pb del genoma, utilizando un diseño de la compañía TIB MOLBIOL y el equipo LightCycler®, con una temperatura específica de desnaturalización (Tm) de 68 °C.

Abstract

Background. Epstein-Barr virus (EBV) viral load is useful not only for detection of an active infection but also as a tumor marker for certain malignant forms. In immunocompromised patients it is related to postransplant lymphoproliferative syndrome (PTLS) with an incidence on the order of 1 to 20%. It is recommended to determine viral load in whole blood and plasma to monitor patients at risk for developing PTLS. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) is a useful tool for this determination. In these determinations the melting curve (Tm) plays an important role because changes in Tm suggest that the target sequence has suffered mutations, although the selected regions for detection and quantification of EBV are highly conserved. We undertook this study to describe the findings of the variations identified in the EBV genome and to perform the detection and quantification in samples of pediatric patients using RT-PCR.

Methods. Results from 352 pediatric patients were analyzed retrospectively in whom investigation of the EBV was performed in peripheral blood and plasma by RT-PCR. For detection and quantification of EBV, a 166-bp fragment of the genome was amplified using a design of TIB MOLBIOL and the LightCycler® equipment with a Tm of 68 °C.

Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México D.F., México

Fecha de recepción: 18-11-09

Fecha de aceptación: 28-05-10

Resultados. De los 352 pacientes estudiados, se detectó la presencia del VEB en 132 (37.5%) y se cuantificó la carga viral. En 5 de los pacientes positivos (3.8%), se identificó un cambio de la Tm. Por medio de electroforesis en gel de agarosa, se comprobó que el amplificado obtenido corresponde al fragmento de 166 pb.

Conclusiones. Consideramos que puede existir una disminución en la concentración de guanina-citosina (G-C) en la secuencia blanco, ya que la Tm sufrió una disminución en todos los casos reportados. Sin embargo, se requiere la secuenciación de los amplificados para determinar con precisión la causa de disminución en la Tm.

Palabras clave: carga viral, pacientes inmunocomprometidos, síndrome linfoproliferativo postrasplante, virus Epstein-Barr.

Results. Of the 352 patients studied, in 132 (37.5%) presence of EBV was detected and quantified the viral load. In five (3.8%) of the positive patients, a change of the Tm was identified. Using electrophoresis running in agarose gel, it was proved that the obtained amplification corresponds to the 166-bp fragment.

Conclusion. The specific product and size of the amplified remained unchanged; therefore, there is a high probability of decrease in the concentration of guanine-cytosine in the target sequence because the Tm showed a decrease in all the reported cases. It is required the sequence of the amplification is required to precisely determine the cause of the decrease in the Tm.

Key words: viral load, immunocompromised patients, posttransplant lymphoproliferative syndrome, Epstein-Barr virus.

Introducción

El virus Epstein-Barr (VEB) fue descubierto por Dennis Burkitt en 1950, mediante el estudio de una forma de cáncer que afectaba la mandíbula de niños y adolescentes del África Ecuatorial. Posteriormente, en 1964, Tony Epstein, Iyonne Barr y Burt Achong examinaron las biopsias de tumores extirpados y encontraron un virus parecido a las partículas de los herpesvirus y establecieron que este virus (VEB) era el causante de estos tumores.¹

Los VEB son virus grandes (100 a 200 nm de diámetro) que poseen una nucleocápside con simetría icosaédrica, rodeada por una cubierta externa que contiene lípidos. Su genoma está constituido por una molécula de ADN bicatenario de 170 a 175 kpb, y codifica para 100 proteínas, aproximadamente. La molécula de ADN está flanqueada, en ambos extremos, por un número variable de repeticiones terminales, cada una de una longitud aproximada de 500 pb.²

El VEB es un virus ampliamente distribuido en todo el mundo; se sabe que más del 90% de la población mundial se encuentra infectada por éste.³ El virus entra en el huésped y provoca la infección, generalmente como resultado de la transmisión oral con un individuo portador.⁴ Cuando la

infección por el VEB se presenta durante la infancia, generalmente pasa clínicamente inadvertida, mientras que si se presenta hasta la adolescencia o después, puede provocar la mononucleosis infecciosa. En los individuos inmunocomprometidos, el VEB ha sido relacionado con enfermedades malignas como el linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, linfoma no Hodgkin y el síndrome linfoproliferativo postrasplante (SLPT) asociado a VEB.³ Durante la infección, el VEB infecta principalmente dos tipos de células, las células epiteliales y los linfocitos B, aunque bajo ciertas circunstancias puede infectar también linfocitos T, células asesinas naturales, células de músculo liso y astrocitos.⁴⁻⁶

Inicialmente, el VEB se une a las células B por medio de la interacción de la glicoproteína gp 350/220, predominante en su envoltura, con el receptor celular tipo 2 del complemento (CR2/CD21).^{7,8} La fusión con la membrana celular y la invasión a la célula huésped es facilitada por la unión de una segunda glicoproteína viral, gp42, a las moléculas MHC clase II y por la adición de otras tres glicoproteínas virales gB, gH y gL.⁹⁻¹¹ Las células B infectadas por el VEB pueden expresar cuatro diferentes programas de genes y el uso del programa va a depender del estado de diferen-

ciación y localización de las células B infectadas. Uno de estos programas es usado para producir virus infecciosos; los otros tres están asociados con la infección latente y estos no producen virus infecciosos.⁴ El VEB produce una infección latente, con reactivaciones esporádicas, debido a que la mayor parte de la población de los linfocitos B humanos infectados mantiene un estado latente de replicación y expresión genética viral, pero poca entra a una fase productiva del virus, a menos que el individuo se encuentre inmunosuprimido. Cuando esto sucede, el virus coloniza las células del epitelio nasofaríngeo donde establece su ciclo lítico de replicación, provocando una respuesta inflamatoria localizada que produce un exudado faríngeo. De esta manera, el virus es llevado por vía linfática hasta los ganglios locales, lo que ocasiona una viremia que desarrolla la linfadenopatía local y generalizada, así como esplenomegalia. Los mecanismos patogénicos por los que el VEB es capaz de inducir la aparición de tumores, se relacionan con las proteínas codificadas por algunos de los genes expresados en la infección latente. Dichos productos inducen diferentes efectos sobre la célula. Las células B infectadas por el VEB pueden expresar un grupo bien definido de genes de latencia que incluye seis antígenos nucleares (EBNAs) y tres proteínas latentes de membrana (LMP1, LMP2A, LMP2B). De estas proteínas de latencia, LMP1 es considerada la oncoproteína más fuerte y es esencial para la inmortalización de las células B, además de que comparte propiedades funcionales con los miembros de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral, particularmente CD40.^{4,12}

La enfermedad que se asocia con mayor frecuencia al VEB en niños trasplantados es el síndrome linfoproliferativo asociado a trasplante (SLPT), que es la proliferación neoplásica de células B en individuos inmunosuprimidos; la incidencia del SLPT se encuentra en el orden del 1 al 20%. El SLPT es una entidad que tiene un amplio espectro de presentación clínica que va desde formas localizadas a formas sistémicas, incluyendo el

linfoma de células B. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de SLPT están la combinación de donador seropositivo/receptor seronegativo, el haber recibido globulina anti-linfocito para inducir la inmunosupresión y el tratamiento con OKT-3 para el rechazo temprano.^{13,14}

En los laboratorios clínicos se ha incrementado el uso de la carga viral como herramienta para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades relacionadas con virus. La carga viral del VEB no solamente sirve para detectar una infección activa, sino también como marcador tumoral de ciertas formas malignas. Existen algunas publicaciones que recomiendan la determinación de la carga viral del VEB en muestras de sangre periférica y plasma, para dar seguimiento a los pacientes en riesgo de padecer el SLPT; sin embargo, no existen valores de corte concordantes a partir de los cuales pueda predecirse el desarrollo de SLPT. Por otra parte, no se tiene información suficiente respecto a la posibilidad de desarrollar enfermedad por el VEB cuando se detecta la infección activa, ya que no todos los pacientes que sufren una infección activa desarrollan SLPT.^{14,15} En estas determinaciones, la temperatura de desnaturalización (Tm) juega un papel relevante, ya que sirve para identificar el producto de la reacción en cadena de la polimerasa; cambios en esta Tm permiten suponer que la secuencia blanco ha sufrido mutaciones, a pesar que los genes seleccionados para la detección del VEB son altamente conservados.

El objetivo de este trabajo es describir los hallazgos de las variaciones identificadas en el genoma del VEB al realizar la detección y cuantificación en muestras de pacientes pediátricos, utilizando la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR).

Métodos

Se analizaron retrospectivamente los resultados de 352 pacientes pediátricos. Se realizó la detección y cuantificación del VEB en sangre periférica y plasma por medio de PCR-TR.

Se utilizaron 3 mL de sangre periférica anti-coagulada con EDTA. Se separó una alícuota de 400 μ L de sangre periférica. La muestra restante se centrifugó a 3 000 rpm por 10 minutos y se tomó una alícuota de 400 μ L de plasma. Para la extracción de ADN se utilizó el equipo MagNA Pure Compac[®], con un juego de reactivos MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Molecular Diagnostics). Se utilizaron los programas de extracción de ADN a partir de 400 μ L de sangre periférica, con un volumen de elusión de 200 μ L, y el programa de ácidos nucleicos totales a partir de 400 μ L de plasma, con un volumen de elusión de 100 μ L. Para la detección y cuantificación del VEB se amplificó un fragmento de 166 pb del genoma utilizando un diseño de la compañía TIB MOLBIOL y el equipo LightCycler[®]; como control positivo interno se utilizó un juego de iniciadores y una sonda que amplifica un fragmento de 278 pb. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 20 μ L, utilizando 5 μ L de ADN extraído de cada una de las muestras. Las mezclas de reacción fueron sometidas a un programa de desnaturalización de la muestra y activación de la enzima a una temperatura de 95 °C por 10 minutos, seguido de un programa de 50 ciclos de amplificación por 5 seg a 95 °C, 10 seg a 60 °C, 15 seg a 72 °C. Después, una curva de desnaturalización para identificar el producto de la PCR derivado del ADN del VEB, con un programa de 1 ciclo por 20 seg a 95 °C, 20 seg

a 40 °C y 0 seg a 85 °C, con un incremento de la temperatura de 0.2 °C/seg y en modo de adquisición de fluorescencia continua. El amplificado fue diseñado para tener una temperatura específica de desnaturalización (T_m) de 68 °C. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Resultados

De los 352 pacientes estudiados, se detectó la presencia de VEB en 132 (37.5%) y se cuantificó la carga viral. En la Figura 1 se muestran 12 curvas de amplificación, que incluyen los seis puntos de la curva de cuantificación (10^1 a 10^6), cinco muestras (de las cuales tres tuvieron un resultado positivo, dos un resultado negativo) y el control negativo. En cinco pacientes, que equivale al 3.8% de los pacientes positivos, se identificó un cambio en la T_m : un paciente con una T_m de 57.4°C (Figura 2a), dos pacientes con 61.5 °C (Figura 2b), uno con 62 °C y uno más con 62.5 °C. La cuantificación del VEB de estos pacientes con T_m disminuida se realizó en dos ocasiones y en tiempos diferentes, observándose el mismo comportamiento, lo que confirma que son hallazgos del VEB y no del proceso analítico. Por otro lado, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa y se comprobó que el amplificado obtenido corresponde al tamaño del fragmento esperado del VEB (166 pb) y del control positivo interno un fragmento de 278 pb, que es útil para

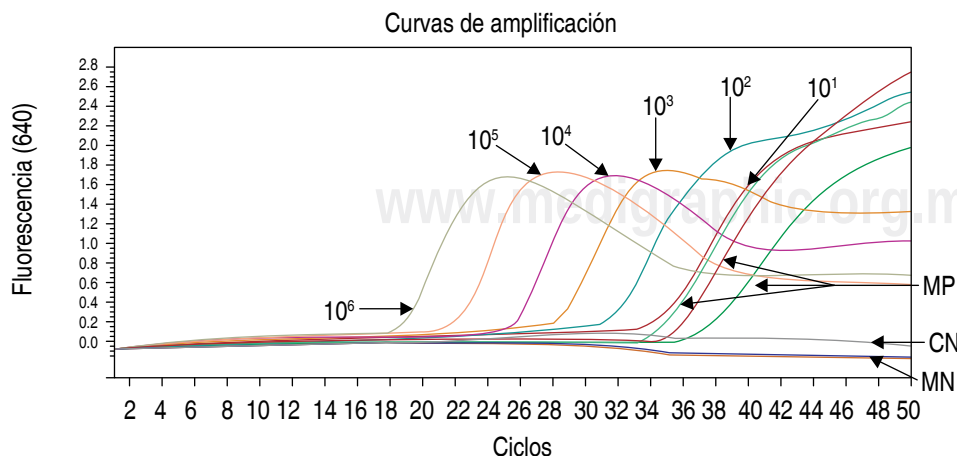


Figura 1. Curvas de amplificación. Curva de cuantificación con concentraciones que van desde 10^6 a 10^1 . CN: control negativo, MP: muestras positivas, MN: muestras negativas.

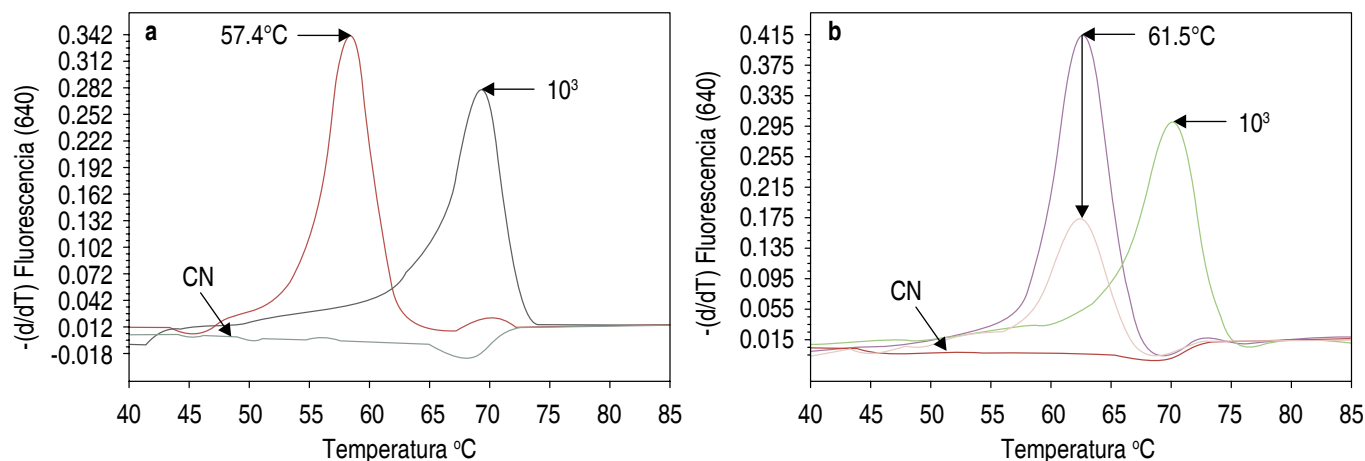


Figura 2. Curvas que nos muestran la temperatura específica de desnaturalización (T_m). 2a) Curvas del estándar de cuantificación 10^3 con una T_m de 68 °C, de un paciente con una T_m de 57.4 °C y del control negativo (CN). 2b) Curvas del estándar de cuantificación 10^3 con una T_m de 68 °C, de dos pacientes con una T_m de 61.5 °C y del control negativo (CN).

demostrar que no existen inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en la mezcla de reacción (Figura 3).

Con el corrimiento electroforético demostramos que se obtiene el producto específico y el tamaño del amplificado no sufre variaciones. De acuerdo a los resultados anteriores, se puede concluir que existe una gran probabilidad de disminución en la concentración de guanina-citosina (G-C) en la secuencia blanco, ya que la T_m sufrió una disminución de 10.6 °C en uno de los casos, 6.5°C en otros dos, 6 °C y 5.5°C en dos más, con respecto a la T_m esperada. Sin embargo, es necesaria la secuenciación de los amplificados para determinar con precisión la causa de disminución de la T_m .

Con este hallazgo surgen varias preguntas que esperamos aclarar en un futuro: 1) el cambio de la T_m , ¿es ocasionado por una disminución en la concentración de guanina-citosina (G-C) en la secuencia blanco?; 2) este cambio ¿tiene algún efecto en la

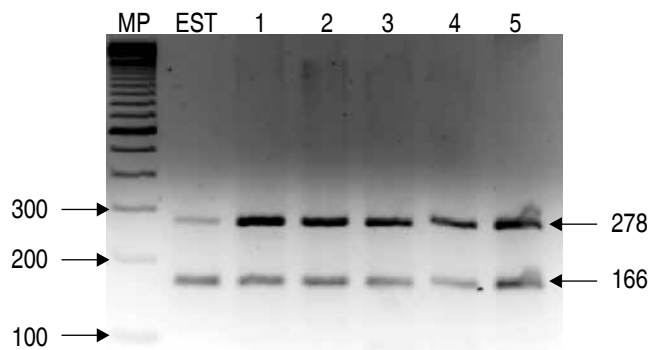


Figura 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa. MP: Marcador de peso molecular 100 pb. EST. Amplificados del punto de la curva 10^3 . 1-5. amplificados de las 5 muestras con T_m inferior.

patogenia del VEB?; y 3) ¿tiene alguna repercusión clínica en los pacientes infectados por VEB?

Autor de correspondencia: M. en C. José Luis Sánchez Huerta

Correo electrónico: jlshuerta@yahoo.com.mx

Referencias

1. Kieff E, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and its replication. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. Fields Virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2511.
2. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. Fields Virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2576.

3. Young KA, Herbert AP, Barlow PN, Holers VM, Hannan JP. Molecular basis of the interaction between complement receptor type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr virus glycoprotein gp350. *J Virol* 2008;82:11217–11227.
4. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001;1:75-82.
5. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. En: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds). *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 2594-2612.
6. Menet A, Speth C, Larcher C, Prodinger WM, Schwendinger MG, Chan P, et al. Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol* 1999;73:7722–7733.
7. Fingerroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:4510–4514.
8. Frade R, Barel M, Ehlin-Henriksson B, Klein G. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1490–1493.
9. Haan KM, Lee SK, Longnecker R. Different functional domains in the cytoplasmic tail of glycoprotein B are involved in Epstein-Barr virus-induced membrane fusion. *Virology* 2001;290:106–114.
10. Haddad RS, Hutt-Fletcher LM. Depletion of glycoprotein gp85 from virosomes made with Epstein-Barr virus proteins abolishes their ability to fuse with virus receptor-bearing cells. *J Virol* 1989;63:4998–5005.
11. Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus entry. *J Virol* 2007;81:7825–7832.
12. Terrin L, Dal Col J, Rampazzo E, Zancai P, Pedrotti M, Ammirabile G, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus activates the hTERT promoter and enhances telomerase activity in B lymphocytes. *J Virol* 2008;82:10175–10187.
13. Kogan DL, Burroughs M, Emre S, Fishbein T, Moscona A, Ramson C, et al. Prospective longitudinal analysis of quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1999;67:1068–1070.
14. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, Sigurdsson L, Qu L, Rowe DT, et al. Serial measurement of Epstein-Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998;66:1641–1644.
15. Patel S, Zuckerman M, Smith M. Real-time quantitative PCR of Epstein-Barr virus BZLF1 DNA using the LightCycler. *J Virol Methods* 2003;109:227–233.