

**OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE
CITOMEGALOVIRUS (CMV) Y EPSTEIN BARR VIRUS (EBV)**



VICTORIA EUGENIA NIÑO CASTAÑO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2004**

**OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE
CITOMEGALOVIRUS (CMV) Y EPSTEIN BARR VIRUS (EBV)**



VICTORIA EUGENIA NIÑO CASTAÑO

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial
para optar al título de Biólogo.**

**Director
JULIO CESAR KLINGER HERNANDEZ
MD. Especialista en Medicina Interna M Sc. en Inmunología**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2004**

Nota de Aceptación

Director Dr. Julio César Klínger Hernández MD.
MD. Especialista en Medicina Interna M Sc. en Inmunología

Jurado

Jurado

Fecha de sustentación: Popayán, _____ de _____ de 2004

AGRADECIMIENTOS

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	10
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GENERAL	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. MARCO TEORICO	15
4.1 CITOMEGALOVIRUS (CMV)	18
4.2. EPIDEMIOLOGÍA	19
4.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	20
4.4. DIAGNOSTICO	21
4.5. TRATAMIENTO	22
4.6. EPSTEIN BARR VIRUS (EBV)	23
4.7. PATOLOGÍA DEL EPSTEIN BARR VIRUS	25
4.8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	25
4.9. DIAGNOSTICO	25
4.10. TRATAMIENTO	26
5. EL GEN DE LA ADN POLIMERASA	27
6. REACCION DE LA POLIMERAZA EN CADENA (PCR)	30
6.1 DISEÑO DE PRIMER Y OPTIMACION DE LA REACCION EN PCR	31
6.1.1 FACTORES QUE AFECTAN EL PCR	31
6.1.2 Temperatura de desnaturalización y tiempo	31
6.1.3 Temperatura de hibridación y diseño de primers	32
6.1.4 Longitud del primer	32
6.1.5 Temperatura de elongación	33
6.1.6 El Buffer	33
6.1.7 Número de ciclos	33
6.1.8 Simples reglas en el diseño de primers	34
7 ANTECEDENTES	35
7.1 EN PRUEBAS DE DIAGNOSTICO	36
8. MATERIALES Y MÉTODOS	39
8.1 CULTIVOS CELULARES	39

8.2 EXTRACCIÓN DE ADN, PROTEÍNAS K Y CLOROFORMO ALCOHOL ISOAMILICO	39
8.3 REACCION DE PCR	40
8.4 DIGESTIÓN CON <i>Bst</i> UI	41
8.5 DIGESTIÓN CON <i>Bam</i> HI	41
9. RESULTADOS	42
9.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD	45
9.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	47
10. DISCUSIÓN	50
11. CONCLUSIONES	54
12. RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	57
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Estructura de Herpes Virus	16
Figura 2. Genoma de los Herpes virus	17
Figura 3. Células Citomegálicas	18
Figura 4. Amplificación de CMV	43
Figura 5. Amplificación de EBV y CMV	44
Figura 6. Prueba de Sensibilidad	46
Figura 7. Digestión de la banda amplificada de CMV	48
Figura 8. Digestión de la banda amplificada de EBV	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. HCMV.M14709.1 HS5POL 2808-3405 604 base pairs	64
ANEXO B. EBV.V01555.1 regiones 154474 –155003.538 base pairs	65
ANEXO C. EBV.V01555.1 regiones 154474 –155003 538 base pairs	66

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Formas de latencia del EBV	24

INTRODUCCIÓN

El Citomegalovirus (CMV) y el virus de Epstein Barr (EBV) pertenecen a la familia *Herpesviridae* por sus características comunes, tales como ADN de doble cadena, cápside viral de 162 cápsomeros y tener regiones muy conservadas en el ADN ¹, además ambos producen mononucleosis infecciosa y otros síndromes clínicos.²

El CMV es importante causa de morbi-mortalidad en pacientes inmunodeficientes, tipo receptores de transplantes, SIDA, recién nacidos e inmunodeprimidos por fármacos citotóxicos y quimioterapia. Se transmite por saliva, leche, heces y orina; originando un síndrome parecido a mononucleosis infecciosa denominado mononucleosis "like", caracterizado por fatiga crónica y disfunciones orgánicas como hepatitis, neumonitis, retinitis, encefalitis, úlceras esofágicas y en colon, más aún, la investigación moderna está encontrando al CMV generando enfermedades cardiovasculares crónicas y agudas, tales como arteriosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y rechazo crónico de órganos transplantados ^{3,4,5,6}.

El EBV es un agente ubicuo que infecta al humano por la saliva en la infancia y la adolescencia, produciendo faringitis, fiebre y linfadenopatía, síntomas característicos de mononucleosis; EBV también induce Cáncer, linfomas y leucemias, por ejemplo: los linfomas de Burkitt y Hodgking, Carcinoma Nasofaríngeo y otros. En SIDA, EBV es el principal causante de desórdenes linfoproliferativos, también EBV se asocia a Esclerosis Múltiple, Lupus Eritromatoso, hipersensibilidad a la picadura de mosquito, síndrome Hemofagocítico, Fibrosis pulmonar y otros cuadros complejos.^{7,8,4,9,10}.

Para detectar estos virus se han desarrollado muchas técnicas, como el cultivo viral en líneas celulares (Shell vial), pruebas serológicas como: anticuerpos IgM específicos de CMV por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), IgG e IgM para CMV y EBV por Enzimo-inmunoanálisis (ELISA), IgM anti-VCA, EBNA-1 y EAd, EAr para EBV. Pruebas histopatológicas como el test de Tzanck para CMV y técnicas moleculares como el PCR e hibridación *in situ*.^{11,12,13}.

El PCR (Polimerase Chain Reaction) es una técnica novedosa inventada por K. Mullins en 1983, utilizada especialmente en investigación, debido a su complejidad es poco utilizada para diagnóstico; sin embargo, paulatinamente las técnicas se están optimizando y popularizando para uso diagnóstico y cuantificar la carga viral,

por ejemplo; laboratorios Roche ya tiene kits para detección y cuantificación CMV.¹⁴ El PCR esta revolucionado el campo de las enfermedades infecciosas demostrando gran utilidad para discriminar poblaciones virales de una misma familia e identificar super-infecciones producidas por dos o más microorganismos¹⁵.

La literatura científica de los últimos cinco años documenta extensamente el uso mas complejo del PCR llamado “PCR Múltiplex” para la amplificación y detección simultánea de todos los herpes virus y otros como VIH y HTLV-1, representando un gran avance científico y asistencial, puesto que esta técnica ahorra tiempo y reactivos, porque una sola prueba logra detectar e identificar varios virus.¹⁵

Es importante implementar el PCR MULTIPLEX en la detección e identificación de los herpes virus en enfermos con cuadros clínicos complejos, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, con meningitis, para diagnósticos más precisos rápidos y certeros, en orden de instaurar tratamientos más rápidos y efectivos, reduciendo así los riesgos y secuelas a los pacientes.^{16,17,18,15,19,20,1,21,22,23,24.}

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones virales son un gran problema en los países desarrollados y subdesarrollados, ocupando primeros lugares en morbilidad y mortalidad en la población.

La seroprevalencia de CMV es de 90% en adultos, siendo el mayor causante de malformaciones en niños, del tipo sordera, ceguera y retardo mental (10 – 15 % de neonatos). Este virus parasita y afecta al sistema inmune desarrollando mononucleosis infecciosa “like” y comprometiendo también el funcionamiento de algunos órganos en forma aguda y crónica. El EBV causa la mononucleosis infecciosa clásica; tiene una seroprevalencia, en países como Estados Unidos, del 90% en adultos ⁴

Como las enfermedades causadas los Herpes virus son un problema mundial generando enfermedades banales y complejas, este proyecto pretende mejorar la detección viral y la experimentación en virología en nuestro medio, aprovechando que la técnica del PCR Múltiple tiene muchos beneficios y aplicaciones, tales como: identificación simultánea y exacta de varios virus, así como diagnosticar formas poco frecuentes y graves de infección (por ejemplo en Sistema Nervioso Central), además para investigación y asistencia de enfermos con cáncer, neoplasias hematológicas, inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes, pues la literatura internacional cada vez muestra a los herpes virus involucrados en estos desórdenes.

Por las razones expresadas, el Laboratorio de Investigaciones en Inmunología y Enfermedades Infecciosas, de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca (líder en el desarrollo de PCR, Citometría de Flujo y técnicas moleculares para las enfermedades infecciosas, como VIH, TBC y herpes virus) considera importante implementar el PCR múltiple para asistencia de enfermos, investigación y docencia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la técnica de PCR para la detección de los virus CMV y EBV en el laboratorio de investigaciones inmunológicas e infecciosas de la Universidad del Cauca.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Establecer un protocolo para la detección de los virus CMV y EBV en PCR, principiando el desarrollo de PCR múltiplex para el laboratorio de Inmunología e Infecciosas de la Universidad del Cauca.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por Herpes virus tipo CMV y EBV son comunes y poco conocidas generalmente, aunque su seroprevalencia sea alta y relativamente benigna, muchas veces estos virus causan afecciones complejas como Cáncer, Glomerulonefritis, Hepatitis, neumonías, asociaciones virales, Trombocitopenia, inmunodeficiencia celular y humoral, trombosis y arteriosclerosis, lesión endotelial, reactivación de otras infecciones y autoinmunidad (tiroides, pancreatitis, esclerodermia) ^{3,4,5,6}.

Johnson Grant y colaboradores en el 2000, publicaron en el Journal of Clinical Microbiology ¹ el PCR MULTIPLEX como metodología interesante y novedosa. Se toma esta metodología para adaptarla a nuestro medio para investigación y asistencia de enfermos, el objetivo principal de este proyecto es estandarizar esta técnica para detección del ADN de herpes virus, aprovechando las secuencias consenso o comunes que estos virus tienen.

4. MARCO TEORICO

Los Herpes virus humanos diseminados mundialmente causan infecciones líticas, persistentes, latentes o de transformación celular. La gran familia *Herpes viridae*, esta actualmente compuesta por 8 virus con características comunes tales como: ADN grande y complejo que puede superar los 235 kb, genoma lineal de doble hebra con diferente tamaño y orientación de los genes (por la presencia de repeticiones directas o inversas que flanquean los genes y que permiten la disposición circular y recombinaciones intra génicas). Los 8 herpes virus se diferencian por las secuencias de sus genes y proteínas, pero son similares en estructura y organización genómica.^{4,13,25.}

Un virión del virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1) posee una envoltura externa de proteínas virales llamadas tegumento y una cápside icosaédrica de 162 capsómeros que encierra la doble cadena de ADN lineal. Cuando el HSV-1 infecta agudamente las células, las lisa generando tres clases diferentes de cápsides, llamadas: cápside A, que es vacía y es un empaque abortivo, la cápside B contiene una sola proteína y la cápside C que contiene el ADN viral. La cápside tiene 125 nm de diámetro y 162 capsómeros, de los cuales 150 son hexaméricos que forman la cara y bordes de la cápside icosaedrica y una pentamérica que se encuentra en cada uno de los doce vértices. La proteína principal de la cápside es la VP5 codificada por el gen UL19. Además la cápside tiene un total de 320 estructuras triméricas llamadas "triplex". Los triplex pueden variar en composición, pero en promedio ellos son heterotrimeros compuestos de una copia de VP 19 codificada por el gen UL38 y 2 copias de VP 23 codificada por el gen UL 18; 6 copias de VP 26 codificadas por el gen UL 35; están localizadas sobre el borde externo de cada estructura hexomérica donde aparecen como protuberancias en forma de cuerno.²⁶

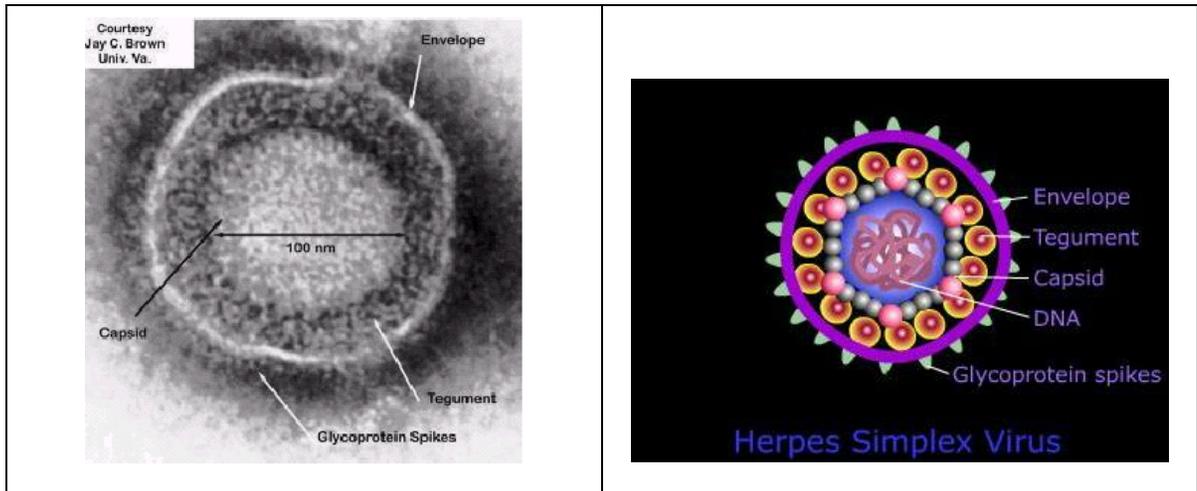


Figura 1. Estructura de Herpes Virus

*Disponible en Internet: <http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html>, <<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/movieindex.html>>

Una vez el herpes virus se une a la célula huésped se fusiona la envoltura viral con la membrana celular liberando el ADN viral en el citoplasma, después el ADN viral migra al núcleo. La replicación y el ensamblaje viral sucede en el núcleo en un orden determinado; los 5 genes IE (Immediate-early o inmediatos tempranos) mediante la ARN polimerasa II del huésped producen un primer grupo de proteínas que inducen la activación de los genes E (Early genes o tempranos) que inducen la síntesis de otro conjunto de proteínas que bloquean a las anteriores y coordina la estimulación de los genes L (Late genes o tardíos) que producen las proteínas estructurales del virus. El tegumento y envoltura son adquiridos al salir de la célula. Las partículas virales son lentamente eliminados a través del Retículo Endoplásmico (RE) a pesar de que la membrana contiene glicoproteínas específicas del virus, en total la cascada de m-ARNs produce unas 50 proteínas. Después todos los Herpes virus persisten en forma latente unidos covalentemente a las histonas que cubren el genoma de la célula huésped.^{13,19.}

Por su tropismo celular y organización genómica los Herpes virus se clasifican en tres familias: 1) Los *AlfaHerpesviridae*, compuesta por Herpes simple tipo 1, tipo 2 y Varicela Zoster que infectan células epiteliales y neuronas sensitivas; 2) *Betaherpesviridae*: CMV y Herpes virus tipo 6 y 7, que infectan monocitos y linfocitos CD4; 3) *Gama herpesviridae*: EBV y Herpes tipo 8 o virus de Sarcoma de Kaposi que son linfotrópicos y oncogénicos principalmente de células B y endoteliales respectivamente.¹³

El genoma general de estas familias se compone de unidades largas (UL) y unidades cortas (US) limitadas o flanqueadas por secuencias repetidas que permiten re-arreglos en las regiones únicas, por lo tanto en existen 4 isómeros de cada herpes virus.¹⁹

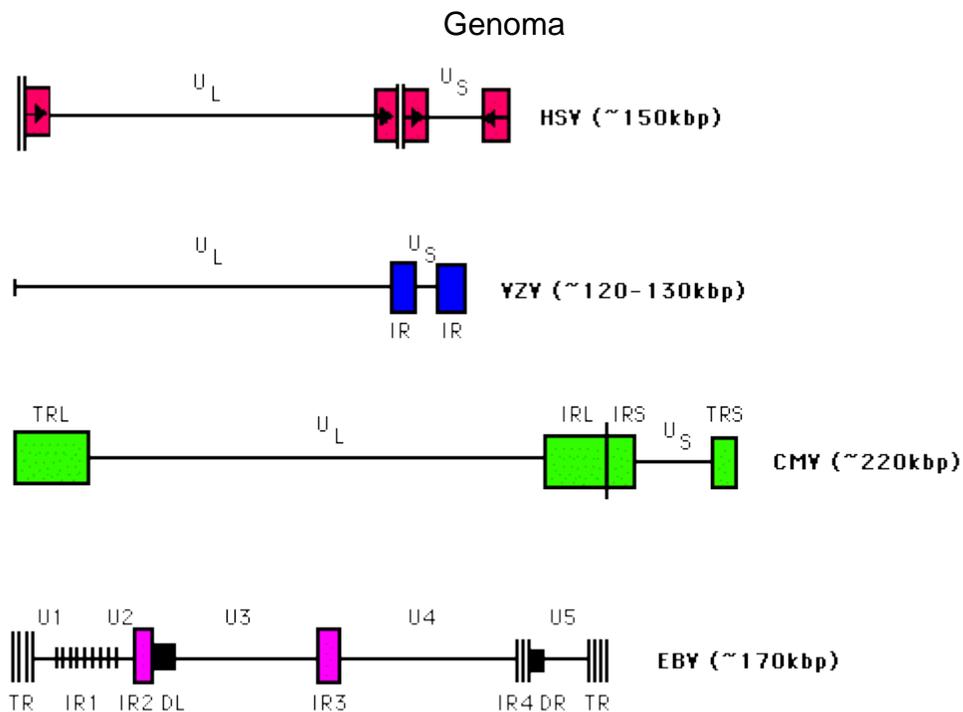


Figura 2. Genoma de los Herpes virus

*Disponible en Internet: < <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Herpesviruses.html>>

Los herpes virus comparten homología en el 80% de sus proteínas, el otro 20% son proteínas únicas para cada virus y algunas se presentan en copias múltiples. Los genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos, reparación del ADN y proteínas estructurales son los más conservados sin embargo las glico-proteínas de la envoltura y tegumento (involucradas en la transcripción, así como en la interacción Hospedero-virus) son mucho menos conservadas.²⁵

4.1 CITOMEGALOVIRUS (CMV)

El CMV se descubrió a mediados de los 60's en niños enfermos con inclusión citomegálica, actualmente es conocido como un patógeno frecuente y relativamente benigno, pero causa un gran espectro de desordenes en niños y adultos especialmente en inmunodeficientes. En individuos sanos o inmunocompetentes da usualmente infección subclínica o asintomática y en las formas más serias el síndrome de mononucleosis like. Múltiples cepas del CMV circulan en un mismo individuo, existiendo evidencia de recombinación intersticial que contribuye a la diversidad del CMV en la población.^{4,13} CMV parásita diversas líneas celulares principalmente monocitos, endotelio, fibroblastos y otras, formando células gigantes por ello su nombre: **Citomegalovirus**. Las células del CMV in vivo son 2 a 4 veces mas grandes que las células vecinas normales y tienen una inclusión nucleolar de 8 a 19 μm rodeada por un halo claro, con apariencia de "ojo de lechuza". Las células citomegálicas se encuentran en una amplia variedad de órganos incluyendo, glándulas salivales, pulmones, hígado, riñones, intestino, páncreas, glándula adrenal, y sistema nervioso central.⁴

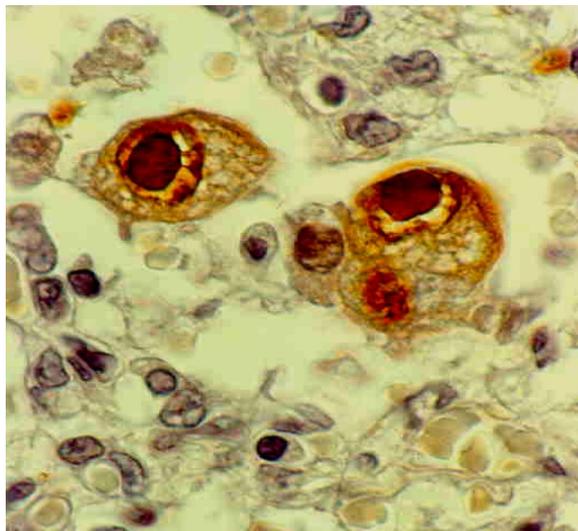


Figura 3. Células Citomegálicas

*Disponible en Internet: <http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html>

4.2 EPIDEMIOLOGÍA

El CMV tiene una distribución mundial, aproximadamente el 1% de recién nacidos en USA es infectado con el CMV, el porcentaje aumenta principalmente en los países no desarrollados y comunidades con pobres condiciones higiénicas y hacinamiento que facilitan la dispersión de la enfermedad. El virus se presenta en la leche, saliva, heces y orina, ha sido detectado en niños desde los primeros meses de edad hasta que empiezan a caminar y en fetos de madres infectadas. El contagio horizontal de persona a persona ocurre en la adolescencia, en los adultos, el CMV es frecuentemente transmitido sexualmente, el virus es comúnmente llevado en las secreciones seminales y cervicales en forma asintomática. Los adultos sexualmente activos son blanco de varios tipos de CMV. Una vez infectado un individuo lleva el virus de por vida, la infección permanece latente con reactivaciones frecuentes por estrés, inmunodeficiencia y otras infecciones.⁴

La transmisión vertical en recién nacidos ocurre por sangre materna infectada primariamente en el embarazo, por el paso a través del canal del parto y después recibiendo leche materna, los infectados *in útero* durante la reactivación materna resultan con menores secuelas que los infectados *in útero* después de una infección primaria materna, presumiblemente debido a la inmunidad materna y a la carga viral. El contagio de niños a adultos ha sido muy documentada, generalmente en guarderías infantiles, alrededor del 70 % de los niños entre 1–3 años transmiten el CMV a sus padres o personas que los cuidan. La infección primaria en niños o adultos induce respuestas vigorosas de linfocitos T especialmente CD8+ que contribuyen al desarrollo de la mononucleosis similar a la generada por EBV. La principal señal de la infección es la aparición de linfocitos atípicos en sangre periférica, además hay activación monoclonal de células B con producción de factor reumatoide y auto-anticuerpos durante la infección por CMV. En la infección latente los linfocitos CD4 y los monocitos son los reservorios del virus, en los portadores sanos, la estimulación de estas células reactiva el virus; en contraste en la infección activa múltiples tipos de células son infectadas principalmente células endoteliales y neutrófilos. La respuesta inmune anti-CMV es muy activa, por ejemplo las células B responden contra los dominios de la glicoproteína B del CMV, los anticuerpos están dirigidos contra esta proteína, mientras que las células citotóxicas (T CD8+) responden casi exclusivamente contra el antígeno pp65 (UL83), los epítopes antígenicos han sido mapeados en humanos.⁴

¿Porque que el virus puede permanecer latente? El CMV codifica genes que manipulan el sistema inmune del huésped que permiten el escape viral de la vigilancia inmune. Por ejemplo: la presentación de los antígenos generados por los genes iniciales (immediate-early) es inhibida por la fosforilación de una fosfoproteína del virión, lo que interfiere con el procesamiento o rompimiento de las proteínas por los proteosomas. Las moléculas HLA clase 1 (esenciales en la presentación de antígenos virales) exhiben una ruta interrumpida en múltiples puntos después de la infección por la interacción con el sistema ATP, el sistema de reciclaje de las moléculas HLA y la maduración terminal de los genes US2, US3, US6 y US 11. La consecuencia de reducir las HLA clase 1 es incrementar la susceptibilidad a la citotoxicidad de las células NK, porque las células requieren la presencia de una señal peptídica desde las HLA clase 1 A, B, o C para ser protegidos de las NK: sin embargo el CMV contiene un HLA homólogo (UL18). Cuando las HLA bajan su regulación al máximo, los UL18 forman complejos con β -microglobulinas y se dirigen a la superficie de la célula. La precisa función de estas proteínas es controversial, pero un estudio demuestra una posible protección contra los NK. Además los genes virales que cambian la regulación de las HLAs, CMV codifica 4 proteínas potenciales receptores G. Los US 28 actúan como receptores específicos de las quimiocinas β y del VIH. El genoma del CMV también puede contener homólogos de la familia de quimiocinas CXC y activar la migración de los neutrófilos. Las perturbaciones en la dinámica de equilibrio podría resultar a favor del patógeno.^{27,28}

4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El CMV congénito presenta microcefalia con o sin calcificaciones cerebrales, retardo del crecimiento intrauterino, ictericia neonatal, púrpura, hepato-esplenomegalia y nacimientos prematuros. La gran mayoría de infantes infectados permanecen asintomáticos, sin embargo neumonías intersticiales y hepato-esplenomegalía prolongadas han sido asociados con CMV prenatal y en la infancia. Otros hechos clínicos relevantes son: bajo peso, adenopatías, rash, hepatitis, anemia y linfocitos atípicos.⁴

Mononucleosis “like” es la manifestación más común del CMV en todas las edades, más frecuente en los adultos en quienes este virus se transmite sexualmente. La incubación es de 20 a 60 días, la enfermedad aguda dura 2 a 6 semanas; con fiebre alta, algunas veces acompañada con escalofríos, cefalea, esplenomegalia, faringitis, linfadenopatías y fatiga crónica, ocasionalmente hay

“rash” o erupción rubeliforme, especialmente al exponerse a ampicilina, poco observados son la neumonía intersticial o segmental, pleuritis, artritis y encefalitis.⁴ En los inmunodeprimidos el CMV es común e importante patógeno. En los pacientes con SIDA, la elevada carga viral de CMV en toda la sangre y el plasma, incrementa el desarrollo de retinitis y enfermedad diseminada que contribuye a la muerte.

En los pacientes trasplantados el CMV induce a una serie de síntomas y enfermedades: incluyendo fiebres, hepatitis, neumonitis, esofagitis, gastritis, retinitis e inmunodeficiencia que favorece súperinfecciones con gérmenes oportunistas tipo *P caranii*, *A fumigatus* y bacterias. El mayor riesgo de desarrollar la infección por bacterias esta en el trasplante de hígado. El CMV esta asociado al rechazo crónico de riñón e induce enfermedad tubulointersticial en los trasplantes, generando glomerulopatía, caracterizada por hipertrofia y necrosis de células endoepiteliales, reducción y obliteración del lumen capilar y acumulación de células mononucleares y material fibrilar en glomérulos y capilares. La incidencia de nefropatía crónica aumenta después de 2 años del trasplante.⁴

El CMV asociado con los síndromes clínicos ocurre cuando las células CD4 <50 x µl. La inmunosupresión inducida por el CMV probablemente contribuye a la deficiencia de los linfocitos T. El síndrome producido por CMV en inmunodeprimidos inicia con fiebres prolongadas, anorexia, fatiga, sudoraciones, mialgia, funciones hepáticas anormales, leucopenia, trombocitopenia y linfocitos atípicos pueden ser encontrados durante varios episodios de la enfermedad.⁴

4.4 DIAGNOSTICO

La detección del antígeno pp65 o ADN en leucocitos de sangre periférica puede acelerar el diagnostico en enfermos trasplantados, inmunodeficiente y personas con SIDA. Tales ensayos pueden dar resultados positivos en menos días que el cultivo celular. La detección por PCR en los fluidos cerebrales puede ayudar a la diagnostico de encefalitis o polirradiculitis.

Los ensayos serológicos (Inmunofluorescencia, hemoaglutinación indirecta ELISA) detectan el incremento de anticuerpos para los antígenos. Incremento de los niveles de los anticuerpos es detectado después de cuatro semanas de la infección primaria y se mantiene en concentraciones altas por años, por ello la

determinación de los anticuerpos tiene dificultades en la interpretación diagnóstica. La detección de IgM anti-CMV es útil en el diagnóstico de la infección reciente o activada. La circulación de factores reumatoides puede muchas veces ocasionar falsos positivos.⁴

El PCR actualmente encuentra un obstáculo adicional en el diagnóstico de infección por CMV: la facilidad con que el virus se reactiva y se replica sin dar lugar a enfermedad dificulta su valoración. Con carácter general solo debe aplicarse a casos en la que es necesario disponer de métodos con la máxima sensibilidad, aunque en teoría puede utilizarse para diagnosticar infecciones por CMV, en inmunodeprimidos debe tener en cuenta las siguientes consideraciones^{4,12}

Infecciones del sistema nervioso central (encefalitis, polirradiculitis, mielitis) este tipo de afecciones suele aparecer en pacientes con SIDA. Se correlaciona con los estudios histopatológicos y con las manifestaciones clínicas.^{4,12} Otras infecciones en pacientes con SIDA (retinitis, esofágitis, duodenitis, colitis etc.) la más frecuente es la retinitis, que suele diagnosticarse por exploración oftalmológica. En algunos casos seleccionados, cabe la necesidad de una diagnosis diferencial (con el VZV). En estos casos la confirmación se llevará a cabo sobre el humor vítreo. No debe aplicarse sobre otras muestras, como orina o sangre, que no confirmen el diagnóstico etiológico de retinitis por CMV. El resto de cuadros se diagnosticaran por cultivo o Shell vial. El PCR es aquí una técnica alternativa cuando se muestran insuficientes las otras técnicas.^{4,12}

4.5 TRATAMIENTO

Las inmunoglobulinas anti-CMV han sido reportadas útiles en la reducción de síndromes asociados con CMV y súper infecciones por hongos o parásitos en receptores de transplantes de riñones y médula ósea. Aciclovir profiláctico ha demostrado reducción de las infecciones por CMV. Sin embargo Aciclovir no es efectivo para la enfermedad activa. El Ganciclovir es una guanosina derivada más efectiva que Aciclovir, inhibe la región del gen UL97 y del ADN polimerasa, algunos pacientes presentan mutación en este gen con resistencia a Ganciclovir.⁴

4.6 EPSTEIN BARR VIRUS (EBV)

Es un virus de la familia *γ herpesviridae*. El genoma del EBV está constituido por una molécula de ADN bicatenario de una longitud aproximada de 172Kb que codifica aproximadamente unas 100 proteínas. La molécula de ADN está flanqueada en ambos extremos por un número variable de repeticiones terminales, cada una de ellas con longitud de 500pb. La recombinación entre estas repeticiones terminales origina una molécula extracromosómica cerrada covalentemente o episoma, que es la estructura que el virus adopta en el núcleo de las células infectadas en forma latente.¹¹

El virus fue descubierto en el linfoma de Burkitt's y está asociado con oncogénesis (carcinoma nasofaríngeo y enfermedad de Hodgkin). Causa mononucleosis infecciosa, caracterizada por fiebres, inflamación de la garganta y linfocitos atípicos. Es la infección más común en los niños, más del 90% de los adultos han sido infectados y tienen anticuerpos para el virus.⁴

La mononucleosis es frecuente en la juventud, en grupos pobres y con bajas condiciones higiénicas. El EBV infecta a los niños a muy corta edad, pero la mononucleosis es inusual. Se adquiere por transmisión oral y tras una fase de multiplicación en la orofaringe se infectan los linfocitos B, en los que se inicia la latencia. En los ciclos líticos hay replicación, síntesis proteica y génesis de nuevos viriones, mientras en la fase de latencia se producen solo algunas proteínas y no se producen viriones. Probablemente el EBV es más peligroso en la fase de latencia, pues inmortaliza las células infectadas, importante en la génesis de algunos tumores.⁴ En los dos ciclos virales – el lítico y el transformante – se produce una variedad de proteínas fundamentales para comprender la patogénesis y las pruebas diagnósticas. En la latencia muchos genes son silenciados, tan solo se expresan 11 genes, se conocen dos ARN nucleares (EBER) altamente expresados en los tumores causados por EBV. Entre los antígenos expresados en células latentemente infectadas figuran los seis del tipo EBNA 1, 2, 3 A, 3 B, 3 C, LP, las tres proteínas latentes de membrana detectables en linfocitos LMP-1, -2A y -2B y dos ARNs pequeños localizados en elevado número en el núcleo (10^6 – 10^7 copias por célula) conocidos como EBER1 y EBER2 (EBERs)⁴. Según los genes expresados en la célula huésped hay tres formas de latencia: latencia tipo I se observa en el Linfoma de Burkitt's y en linfocitos B infectados que circulan. En esta forma la expresión viral queda limitada a los EBERs y a la proteína EBNA-1; con estas proteínas la célula infectada logra escapar de las células citotóxicas.

La latencia tipo II, se asocia a neoplasias, las proteínas expresadas son: EBNA-1 y LMP-1, LMP-2 A y 2 B (proteína oncogénica) y los EBERs. Esta latencia característica de la enfermedad de Hodgkin y el carcinoma nasofaríngeo. La latencia tipo III esta en líneas linfoblastoideas y en mononucleosis infecciosa. La gran mayoría de los trastornos linfoproliferativos de linfocitos B se asocia a inmunodeficiencia celular. La inmunosupresión permite que los linfocitos B infectados expresen toda la gama de proteínas asociadas a la infección latente sin que sean reconocidos por las células citotóxicas.

Tabla 1. Formas de latencia del EBV.

	EBNA-1	EBNA-2, -3(A-C),-LP	LMP-1	LMP-2A/B	EBERS	BHRF1
Latencia I LB	+	-	-	?	+	?
Latencia II EH, CNF	+	-	+	+	+	?
Latencia III TLP-PT TLP-VIH LCLs	+	+	+	+	+	+

*CNF: carcinoma nasofaríngeo; EH: enfermedad de Hodgkin; LB: linfoma Burkitt; TLP-PT: trastornos linfoproliferativos post-transplante; TLP-VIH: trastornos linfoproliferativos asociados al SIDA; LCLs: líneas celulares linfoblastoides.

En la fase lítica, además de expresar los anteriores, también figuran los antígenos precoces (EA) y el antígeno de la cápside VCA. Los antígenos EA pueden aparecer como difusos, EA_d con un patrón de tinción citoplasmático y nuclear o restringidos, EA_r con patrón de tinción citoplasmático perinuclear.¹¹

4.7 PATOLOGÍA DEL EPSTEIN BARR VIRUS

El EBV prolifera en linfocitos B, aumentando el tejido linfoide, en la fase aguda de la infección una de cada cien células B es infectada por EBV. El EBV se une al receptor CD21 presente en células epiteliales y linfocitos B, infectando inicialmente las células epiteliales, luego linfocitos B donde el virus se replica o permanece latente.

La infección aguda induce activación policlonal de linfocitos B y anticuerpos. En la primera semana de infección se incrementa el número de células CD8+ y NK, en cambio las CD4+ decrecen, reduciendo la relación CD4/CD8 así la inmunidad celular controla la proliferación del EBV. Los niveles de citocinas como Interferón α , Interleukinas IL-2, IL-10 se expresan en mayor proporción en las células HLA-DR⁺, sugiriendo activación de linfocitos T en las infecciones agudas y la contribución de las linfocitos T en la producción de citocinas ^{4,29}.

4.8 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Después de 4–6 semanas de incubación se manifiesta la mononucleosis infecciosa con fatiga, malestar y mialgia, luego hay fiebre, faringitis y linfadenopatía en adolescentes y personas jóvenes. La mononucleosis es poco común en niños y los síntomas son inespecíficos, incluyendo fiebre, fatiga, mialgia y malestar en contraste con la faringitis, linfadenopatía, esplenomegalia, linfocitos atípicos encontrados en adultos. ⁴

4.9 DIAGNÓSTICO

Serológicos: La determinación de anticuerpos heterófilos es precoz, sensible y específica de mononucleosis por EBV, tiene el inconveniente de ser negativa al menos en un 50% de los niños menores de 5 años.

Los anticuerpos heterófilos aparecen en el 90% de adultos afectados. Estos anticuerpos son IgM que aglutina eritrocitos de buey y oveja, sorprendentemente no reaccionan con ninguna estructura viral, son transitorios y desaparecen después de la etapa aguda. La prueba Paúl-Bunnell-Davidson detecta anticuerpos heterófilos que no aparecen en otras enfermedades, frecuentemente esta prueba se realiza con técnica de "spot" o mancha llamado MONOTEST cuantitativo, alternativamente, puede cuantificarse con diluciones en microplaca.⁴

4.10 TRATAMIENTO

No existe tratamiento específico para las infecciones por EBV, el Aciclovir no muestra un gran impacto contra la mononucleosis. Pero dosis de 400 a 800mg/5 veces al día dan un efectivo tratamiento contra la leucopenia. Nuevos tratamientos incluyendo nuevos antivirales, Interferón α y la infusión de células T donadas o células citotóxicas específicas para el EBV esta siendo estudiadas.⁴

5. EL GEN DE LA ADN POLIMERASA.

Dentro de los genes tempranos esta el gen UL 54, el cual codifica la polimerasa de ADN, este gen es altamente conservado en los Herpesvirus. La polimerasa de ADN tienen siete secuencias conservadas, estas regiones son enumeradas de la VII según el grado de conservación dentro del gen, siendo la región I las más conservada. El rol molecular de las regiones está bien definido: las regiones I y II forman el sub-dominio mayor de la polimerasa, contienen tres residuos de ácido Aspártico; esencial para la actividad de polimerasa. Las regiones III y VI forman el sub-dominio en forma de dedo y las regiones V y VII el sub-dominio en forma de pulgar. Estas cuatro regiones parecen flanquear el sitio de catálisis en sub-dominio mayor, el cual juega un rol en la posición de plantilla y primer. La región IV hace parte del dominio de la exonucleasa 3'→5', haciendo parte del rol estructural. Por último la región A, hace parte de la gran región llamada δ-región C, esta es la región poco conservada, parece que hace parte de la exonucleasa 3'→5' que incluye la parte los residuos catalíticos de Tirosina y ácido Aspártico.³⁰

En los genomas de todos los herpes, el gen de la polimerasa de ADN tiene una homología del 80%,⁸ esto facilitó que Johnson y colaboradores diseñaran los primers que amplifican esta región. El análisis de la secuencia de ADN realizada por Johnson y colaboradores con el programa Runner for Windows 3.04 con los siguientes números de acceso en el Gen Bank: **V01555** para el EBV y **M14709** de CMV, determinaron dos primers los cuales tienen un 60% de GC, denominados HSV-P1 con 26 nucleótidos y HSV-P2 con 30 nucleótidos.¹

La secuencia del primer denominado HSVP1 (5'GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC'3) en un análisis de BLASTA revela lo siguiente:

gi|330640|gb|M14709.1|HS5POL Human cytomegalovirus (HCMV) DNA polymerase (pol) gene (put.), complete cds and glycoprotein B gene, 3' end
Length = 5280

Score = 32.2 bits (16), Expect = 0.39
Identities = 19/20 (95%)

6. REACCION DE LA POLIMERAZA EN CADENA (PCR)

En 1983 Kary Mullis de Cetus Corporation desarrolló una técnica que amplifica un fragmento específico de ADN sin la necesidad de células bacterianas. Mullis y colaboradores tomaron ventaja de una polimerasa de ADN (TAQ polimerasa) resistente a altas temperaturas, presente en una especie bacteriana que vive en aguas termales a más de 90°C (*thermophilus aquaticus*), superando ampliamente el límite de temperatura donde una bacteria común podría ser destruida, con este principio desarrollaron el PCR (Polimerase Chain reaction).³¹

El procedimiento básico usado en el PCR empieza con un ADN blanco que se mezcla con los cuatro de-oxi-nucleótidos (dNTPs), la enzima TAQ y dos fragmentos de oligonucleótidos que son complementarios al ADN blanco en el terminal 3' (los primers). Los primers se adhieren específicamente al reconocer el fragmento de ADN que se quiere amplificar durante los pasos de la replicación. La mezcla se calienta entre 92°C a 94°C, ahí las dos hebras de ADN se abren. La mezcla se enfría para permitir que los primers se hibridicen o se peguen a la cadena de ADN blanco y permitir a la polimerasa adherir los nuevos nucleótidos en la terminal 3' de cada primer. Así la polimerasa extiende los primers enlazados al ADN blanco y formando la cadena. La temperatura es aumentada otra vez para separar las dobles cadenas recién formadas y luego enfriadas para permitir la síntesis de nuevas cadenas con los primers respectivos. Cada ciclo duplica la cantidad del fragmento de ADN flanqueada por los primers enlazados identificando el fragmento que se desea amplificar. Billones de copias son generadas en pocas horas. El PCR tiene múltiples aplicaciones, entre ellas es útil en investigaciones forenses, modificar el ADN insertando secuencias en sitios de restricción (ingeniería genética, mutagénesis, inserción y delección de genes, diagnóstico de microorganismos, detección de alteraciones genéticas).³¹

6.1 DISEÑO DEL PRIMER Y OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN PCR.

6.1.1 Factores que afectan el PCR

6.1.2 Temperatura de desnaturalización y tiempo.

La asociación complementaria hecha por los enlaces de hidrógeno de una cadena simple de ácidos nucleicos se denomina hibridación: dos secuencias complementarias forman enlaces de hidrógeno entre sus bases complementarias (G a C y A a T) y forman una molécula de doble cadena estable anti-paralela.

Es ampliamente conocido que calentando la doble cadena de ADN a temperaturas mayores a 55°C, las cadenas se disocian y enfriándolas rápidamente se reasocian, la disociación se llama desnaturalización. Adicionalmente si los ácidos nucleicos son calentados en búferes menores a 150 mM de NaCl, la temperatura es menor de 100°C, haciendo que el PCR trabaje a temperaturas de desnaturalización entre 91-97°C.

La Taq polimerasa tiene una vida media de 30 minutos a 95 °C, se recomienda que no se use por más de 30 ciclos; reduciendo la temperatura de desnaturalización después de 10 ciclos en fragmentos de 300 pb o menos y reduciendo la temperatura a 88°C en concentraciones G+C del 50% se aumenta la eficiencia de la enzima. hasta 40 ciclos.

El tiempo en altas temperaturas es la principal razón para que la Taq se desnaturalice y pierda actividad, no importa si la temperatura es reducida o no. Normalmente el tiempo de la desnaturalización es de 1 minuto a 94 °C, es posible en secuencias pequeñas reducir el tiempo en 30 segundos o menos. Incrementando la temperatura de desnaturalización y reduciendo el tiempo se recomiendan 96 °C para 15 segundos.

6.1.3 Temperatura de hibridación y diseño de primers.

La longitud del primer y la secuencia son parámetros importantes para una amplificación exitosa; la temperatura de disociación (desnaturalización) de una secuencia de doble hebra se incrementa según el largo y el contenido de (G+C): Una simple ecuación se representa el cálculo de esta temperatura.

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

La temperatura de hibridación para el PCR depende de la longitud y composición del primer. Reduciendo 5°C la temperatura de hibridación hace que ambos primers se enlacen a secuencias inespecíficas, produciendo un desapareamiento interno o un apareamiento parcial que puede ser tolerado. Esto conduce a la amplificación de la secuencia no requerida y la reducción en el producto. Cuando la temperatura de hibridación es muy alta el producto es menor; cuando los primers son diferentes y tienen diferente temperatura de hibridación no hay un producto apreciable y se produce amplificaciones asimétricas. El tiempo de la hibridación de los primers no debe ser prolongado, siendo eficiente en 30 segundos o menos, a menos que la temperatura de hibridación se acerque a la temperatura de desnaturalización o los primers sean largos.

6.1.4 Longitud del primer

La optima longitud del primer depende del contenido de (A+T) y de la temperatura de desnaturalización. La asociación de un primer de 17 bases o más es extremadamente específico, más que la especificidad de un anticuerpo monoclonal. Un primer demasiado largo significa una temperatura de hibridación alta, y de todos modos no se evita el desapareamiento y productos inespecíficos.

6.1.5 Temperatura de elongación.

Normalmente es 70 a 72 °C en 0.5 – 3 minutos, siendo en 70 °C la actividad óptima de la Taq polimerasa, extendiendo los primer en 100 bases/seg. Los fragmentos mayores de 2kb requieren tiempo largos de 1 minuto y los fragmentos de 3kb de 3 minutos.

6.1.6 El Buffer

Estas son las concentraciones recomendadas en el Buffer:

10-50 mM tris HCL ph 8.3

50 mM KCL, 1.5 mM o mas de MgCl₂

primer 0,2-1µM cada uno

50 – 200 µM cada dNTP

no iónico detergente Tween-20

6.1.7 Número de ciclos

El número de amplificaciones necesarias para producir una banda visible en el gel de electroforesis depende de la concentración del producto. Se recomienda entre 40 y 45 ciclos para amplificar 50 moléculas blanco y de 25 a 30 ciclos para amplificar 3 x 10⁵ moléculas. Cuando no hay proporcionalidad se forma el efecto altiplano, la cual es atenuación exponencial del producto amplificado. Causado por la degradación de los reactantes (dNTPs, enzima), agotamiento de los reactantes (primers, dNTPs), inhibición del producto final (formación fosfatos) y competición de los reactantes.

6.1.8 Simples reglas en el diseño de primers

Los primers deben ser de 17 a 28 bases de largo.

Composición de las bases entre 50-60% de (G + C)

Primers en la dirección 3' terminal en C o G o CG o GC.

La temperatura de hibridación entre 50 y 80 °C

Con mas de 3 C o G en la posición 3' terminal, compromete el apareamiento en secuencias ricas en G o C.

Los terminales 3' no deben ser complementarios, de otra manera los dímeros de los primers serian preferencialmente sintetizados en otro producto.

Los primers complementarios deben evitarse.

7. ANTECEDENTES

Estos procedimientos moleculares están revolucionando la virología. El PCR amplifica el ADN viral en forma directa y específica. Se están trabajando diferentes formas de PCR tanto en investigación, como en diagnóstico; por ejemplo: el PCR MÚLTIPLEX ahorra tiempo y reactivos porque en un solo tubo se realizan varias reacciones, es útil en la identificación de varios agentes simultáneamente, virus como: HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, HHV-6, y EBV; bacterias: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma catarrhalis*, y *Alloiococcus otitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacteriosis*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas intermedia*, y *Porphyromonas gingivalis*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *M. Genitalium*; Parásitos: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania spp.* *Leishmaniasis*; y también en pruebas combinadas: HSV, *H. ducreyi*, y *T. pallidum* HPVs, HSV, y *C. trachomatis* Adenovirus, HSV, y *C. trachomatis* *Keratoconjunctivitis* EV, virus de la influenza A y B, RSV, PIV tipos 1 y 3, adenovirus, *M. pneumoniae*, y *C. Pneumoniae*.¹⁵

El PCR MÚLTIPLEX está basada en la homología de diferentes genomas, existe el PCR MÚLTIPLEX de varios primers que genera adaptaciones en la temperatura y concentraciones de los reactivos que participan dentro de la reacción, de esta manera amplifican varios fragmentos de ADN de diferentes genes o genomas; otra técnica especial es el PCR inversa o RT-PCR que utiliza inicialmente una enzima transcriptasa inversa para convertir ARN mensajero en cADN que se amplifica y se identifica posteriormente con hibridización.¹⁵

Como los Herpes virus tiene una homología del 80% en su genoma, los estudios basados en la detección múltiple son de gran interés e impacto. Así pues durante varios años se ha perfeccionado el PCR MÚLTIPLEX para el diagnóstico de esta familia, desde 1991 la amplificación consenso para los tipos HSV-1, HSV-2, CMV, y EBV del gen de la ADN Polimerasa se desarrolló como uno de los primeros PCR MÚLTIPLEX.²¹

Varios estudios comparativos del PCR MÚLTIPLEX y otras pruebas se han realizado, encontrando para el PCR MÚLTIPLEX mayor sensibilidad comparada con la Microscopía Electrónica.^{1,24} Un estudio de validación del PCR MÚLTIPLEX encontró aumento de la detección de CMV y HSV (30 y 175% respectivamente) versus las técnicas tradicionales tipo cultivo y el IFI, con sensibilidad de 100% semejante a IFI. Respecto al tiempo gastado para analizar una muestra fue más

rápido el PCR MÚLTIPLEX, por ejemplo en HSV se redujo de 4 días a 1, para VZV de 7-14 días a 1 día y para CMV desde 4 días a 28 días en cultivo a 1 día en el PCR múltiplex.³² El PCR MÚLTIPLEX para el Herpes virus se enfrentó al PCR para de una sola detección, hallando que las pruebas son similares en sensibilidad y especificidad, concluyendo que el PCR MÚLTIPLEX es un método revolucionario en el diagnóstico por rápido, específico y sensible.^{21,33,34.}

Existen métodos comerciales de PCR MÚLTIPLEX superiores en tiempo y evitan contaminaciones, por ejemplo: el PCR en tiempo real, el método "Stair Primer" y el sistema de Ligth Cyler (Roche Molecular Biochemicals) ²⁶ son métodos que detectan y cuantifican todos los Herpesvirus; el PCR en tiempo real es similar en sensibilidad pero mas rápido comparado con el " Stair Primer" ¹⁷ este sistema de cuantificación es muy recomendable, por ser capaz de determinar los niveles de ADN en una muestra pequeña y valiosa como el líquido cefalorraquídeo y pacientes inmunocomprometidos.¹⁶ El sistema Ligth Cyler (Roche Molecular Biochemicals) es un PCR combinado con fluorímetro donde los productos de PCR son identificados con varios químicos fluorescentes. El sistema provee rápidos resultados por su temperatura de transición rápida y los análisis de datos en línea, lo que reduce el riesgo de contaminación y sus datos salen inmediatamente. La desventaja de este sistema es la poca sensibilidad comparada con el PCR múltiplex.²⁶

7.1 EN PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Los virus HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, EBV y HHV-6 están altamente relacionados con enfermedades de Sistema Nervioso Central, el desarrollo del PCR MÚLTIPLEX se ha enfocado en ese tipo de muestra clínicas debido a que no existe un Gold Estándar para estas muestras de difícil manejo, donde el diagnóstico rápido es imprescindible. En 1996 Cassinott y colaboradores desarrollaron un método de PCR múltiplex para HSV-1 y HSV-2 en un estudio retrospectivo de 417 muestras de LCR, encontrando 2,6% positivos para HSV-1 y 1% para HSV-2; Minjolle y colaboradores (1999), compararon el PCR consenso y PCR de una sola detección en 142 en LCR, detectando en el PCR de una sola prueba el 2.4% de HSV-1, 0,8% de HSV-2, 10% de CMV, de 66 muestras el 7,5% para VZV. En el PCR consenso de Herpes virus el 2,8% para HSV-1, 3,5% para HSV-2, 7,7% para CMV, 5,6% para EBV, 7,7% para VZV, y 1,4% para HHV-6 y de forma muy interesante detectó coinfecciones entre CMV, VZV, HSV-2 y VZV y HSV-2; CMV y HHV-6.

Quereda y colaboradores (2000) reportan la detección simultánea de 5 Herpesvirus en 251 muestras LCR de 219 pacientes VIH+. El VIH se detecto en 93 pacientes (36%), CMV fue el más frecuente con 25% mientras que EBV, VZV, HSV Y HHV-6 presentaron 7, 4, 3 y 1 % respectivamente. La prevalencia de la enfermedad por CMV en 156 pacientes con estabilidad clínica se estimó en 19,8%, sensibilidad de 0,87 (0,75-0,99) y especificidad de 0,95 (0,091-0,99), valor Predictivo positivo (VPP) 0,82, Valor Predictivo Negativo (VPN) 0,97, tasa de probabilidad positiva (RPP) de 14,4 y tasa de probabilidad negativa (RPN) 0,03. Para linfoma cerebral la prevalencia es de 7,7%, sensibilidad de 0,33 (0,05 - 0,94), especificidad 0,97 (0,94–1) VPP 0,5, VPN 0,95, RPP 11, y RPN 0,68. En la enfermedad por VZV una prevalencia 2,6%, sensibilidad 0,5 (0,01–0,99) especificidad 0,99 (0,98–1) VPP 0,5, PPN 0,99, RPP 50 y RPN 0,5.

Frías y colaboradores (2001) en un estudio preliminar de 45 muestras de LCR mostraron 5 positivos para HSV-1, 3 para EBV y 2 coinfecciones de HSV y EBV. Markoulatos y colaboradores (2001) reportan un PCR MÚLTIPLEX con una sensibilidad de 0,001 y 0,03 del 50% de células infectadas en cultivo y en LCR de pacientes con encefalitis, meningitis y meningoencefalitis, con 3,5% para HSV-1 en encefalitis, 4,6% para VZV en meningitis y 1,16% de HSV-1 en neonatos y 1,16% para CMV en neonatos.

En un estudio prospectivo con cuantificación de ADN en LCR se estimó la prevalencia de Herpes virus en un 26,6% durante los años 1995-2001.¹⁶ Minjolle y colaboradores (2002) en un estudio posterior al de 1999, reportan en 180 muestras de LCR de pacientes HIV+ al CMV como el más frecuente, igual que en el estudio de Quereda (2000) con un porcentaje de 13% seguido de EBV en un 10,6%, VZV 5,3%, HSV/1 y HSV/2 en 1,3%. Por último Calvario (2002) reporta en su estudio de 51 muestras de LCR al menos 1 positivo para un tipo de Herpes virus, de los cuales 14 para HSV-1, 7 para HSV-2, 12 para CMV, 5 para EBV, 3 para VZV y 5 para HHV-6 y coinfecciones con HHV-6 con CMV o EBV ambas reportes en paciente inmunosuprimidos.

PCR MÚLTIPLEX se implementó en otros tipos de muestras clínicas, Wyatt y colaboradores (2001) la aplicaron en vesículas, de 58 pacientes hubo 20 positivos para HSV-1 y 15 para VZV. La validación diagnóstica del PCR MÚLTIPLEX en muestras de humor vítreo en Uveítis reportan VZV, HSV, CMV y T gondii.³³ Para hallar relación de herpesvirus y enfermedades oculares como Herpes ocular, Zoster, conjuntivitis ocular y ojo seco se desarrolló el PCR MÚLTIPLEX a partir de lágrimas reportando: en queratitis dendrítica 3 pacientes positivos para HSV y 4 pacientes con Zoster ocular positivos para VZV. HSV-1 y HSV-2 fueron encontrados en 2 muestras de pacientes con Cornea Metaherpética, 28 casos de ojos secos, de los cuales 2 fueron positivos para HHV-6 y más tarde fueron asociados con EBV, también se encontró el HHV-6 en 4 casos de 54 con

conjuntivitis papilar, esta frecuencia de HHV-6 sugiere un nuevo patrón de latencia o reactivación para este virus. La detección de EBV en 1 de 80 ojos sanos confirma un sitio potencial de latencia para este virus.¹⁴ Esta técnica está empleándose en un amplio rango de muestras, en lesiones cutáneas, úlceras o secreciones, se ha encontrado el HSV-1, EBV, CMV, HHV- 6 B y HHV-7.³ En lavados broncoalveolares el CMV ha sido el mas frecuente en pacientes con transplantes (71%), también se ha detectado el HSV-1 y HHV-6B.^{32,1} En biopsias gastrointestinales HSV-1 y HHV-7, VZV en biopsias de cavidad oral, hígado, HSV-1, HSV-2 VZV y CMV, con mas frecuencia en pacientes con transplantes.³² En biopsias linfoides EBV y HHV-6B, en biopsias pulmonares CMV, HHV-6B, en biopsias del corazón CMV y HHV-6B, aspirado de medula ósea VZV,¹ en muestras genitales, ojos y secreciones inespecíficas el HSV-1 es el mas frecuente, le sigue el HSV-2 en la muestras genitales y VZV, es importante poder distinguir estos 2 virus.³² En sangre el CMV es el mas frecuente, siendo positivo en plasma y negativo en la fracción de leucocitos, contrario al EBV que es negativo en el plasma, también se detectan en sangre HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, y HHV7, el único que se ha reportado en Sarcoma de Kaposi en pacientes con VIH positivos y negativos en el Herpes tipo 8.^{1,32.}

El PCR MÚLTIPLEX facilita la detección y diagnóstico de las enfermedades infecciosas, demostrando que es óptimo para la múltiple detección de patógenos (Virus, bacterias, parásitos y hongos) en diferente muestras clínicas.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Precauciones: Los cultivos virales se procesa en cabinas de bioseguridad tipo II, después de ser inactivados con alcohol al 90% se procesan en un lugar previamente descontaminado. Cada reactivo debe ser preparado antes de cada solución principal o fuente y luego se distribuye en alícuotas. La preparación de la solución inicial, la extracción del ADN y el PCR deben realizarse en tres lugares diferentes. Cada lugar debe tener sus propios implemento (pipetas, guantes, etc). Los cuidados para evitar la contaminación por ADN extraño, incluyen el cambio constante de guantes cuando se cambia de lugar y frecuente descontaminación de los lugares con Hipoclorito de Sodio o UV.

8.1 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron cultivos virales como controles positivos, la cepa AD-169 de CMV cultivada en células de fibroblastos humanos en medio RMPI completo donada por el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle y la cepa de EBV cultivada en células de monocitos de tití en medio RMPI completo fue donada por FIDIC (Fundación Instituto de Inmunología de Colombia). A estos cultivos se les extrajo el ADN.

8.2 EXTRACCIÓN DE ADN, PROTEÍNAS K Y CLOROFORMO ALCOHOL ISOAMÍLICO

En un tubo de 1,5 ml se adicionó 200 μ l de cultivo celular de CMV o EBV mas 500 μ l de etanol al 70% para inactivar los microorganismos, se mezcló y se centrifugo por 10 minutos a 14.000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf 5415 C), se descarta el sobrenadante y el "pellet" quedo remanente en el fondo del tubo. (Se esperó hasta que el alcohol se haya evaporado para continuar el siguiente paso). Luego se adicionó 320 μ l de tris-EDTA (TE) con un pH de 8.0, 30 μ l de sodio dodecil sulfato (SDS) al 20% y se incubó a 65°C por 1 hora, para lisis y digestión

celular. Se adicionó 50 μl de proteínasa K de una dilución de 7mg/ml y se incubó por 3 a 18 horas a 55°C, para desnaturalizar las proteínas celulares. Luego se adicionó 500 μl de cloroformo en alcohol Isoamílico, se mezcló muy bien por 30 minutos y se centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm; se observaron dos fases separadas por un anillo blanco, este procedimiento separó las proteínas y demás detritus celulares del ácido desoxirribonucleico. Se tomó la primera fase sin tocar el anillo y se vertió en un tubo marcado. A esto se le adicionó alcohol absoluto frío y 30 μl de Acetato de Sodio hasta llenar el tubo, se mezclaron y se mantuvo por 2 horas ó de durante la noche a -30°C para precipitar el ADN. Después se centrifugó por 15 minutos a 14.000 rpm, se descartó el alcohol y se lavó con 500 μl alcohol a 75% frío, se centrifugó por 10 minutos a 14.000 rpm, luego se descartó el sobrenadante y se esperó hasta que el tubo se secó y por último se recuperó el ADN con 100 μl de Agua di-destilada estéril.

8.3 REACCION DE PCR

Cada reacción se realizó en tubos de Eppendorf de 0.2 μl en un volumen de 50 μl cubierto con dos gotas de aceite mineral. Esta reacción contenía 5 μl de buffer 10X (Promega), 5 μl de Mg CL₂ a 25mM (Promega), 5 μl de dNTP a 2.0mM cada uno (Promega), 37.5 pmol de cada Primer, 0.2 μl de Tag Polimerasa 1U (Promega) y agua di-destilada.

La mezcla "master" se dividió en tubos para PCR y se agregó el ADN diluido en agua di-destilada y dos gotas de aceite mineral. La mezcla se colocó en un termociclador (MJ Research) y después de un "Hot-PCR" por 10 minutos se adicionó 0.2 μl de Taq Polimerasa (Promega). Con los primer de HSV-1 y HSV – 2 se realizaron los siguientes ciclos: preincubación a 95°C por 12 minutos, entonces 3 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, luego 37 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, autoextensión de 5 segundos y 72°C por 1 minuto y una incubación final de 72°C por 3 minutos. Después 20 μl de la mezcla es corrido en un gel de Agarosa al 1.5%.

8.4 DIGESTIÓN CON *Bst*UI

En un tubo de 0.2µl se colocó 30 µl de la mezcla amplificada por PCR más 4,5 µl del buffer de la enzima (New England's BioLabs) y 3 µl de la enzima *Bst*UI (New England's BioLabs) y 7,5µl de agua bidestilada para un volumen total de 45 µl. La reacción fue incubada por 2 horas a 60°C. Luego se corrió en un gel de Agarosa al 1.5%.

8.5 DIGESTIÓN CON *Bam*HI

En un tubo de 0.2µl se colocó 30 µl de la mezcla de PCR mas 4,5 µl de buffer de la enzima (New England's BioLabs) y 3µl de la enzima *Bam*HI (New England's BioLabs) y 7,5µl de agua bidestilada para un volumen total de 45µl. La reacción es incubada por 2 horas a 37°C. Después se corrió en un gel de Agarosa al 1.5%.

9. RESULTADOS

En la estandarización se tomó cultivos celulares de CMV en fibroblastos humanos de Microbiología Univalle y EBV en células de Tití donadas del FIDIC.

Se tomaron 200 μL de cada cultivo, se extrajo el ADN total según el protocolo descrito. Se midió la concentración del ADN de CMV en un espectrofotómetro (DMS 100) la cual fue de 1,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se realizó el PCR, adicionando la Taq a los 10 minutos a 95 °C amplificándose una banda de 604 bp (Figura 4). Este mismo protocolo se aplicó a 5 μl (180ng/ μl) ADN de EBV con resultando una banda de 538 bp (Figura 5).

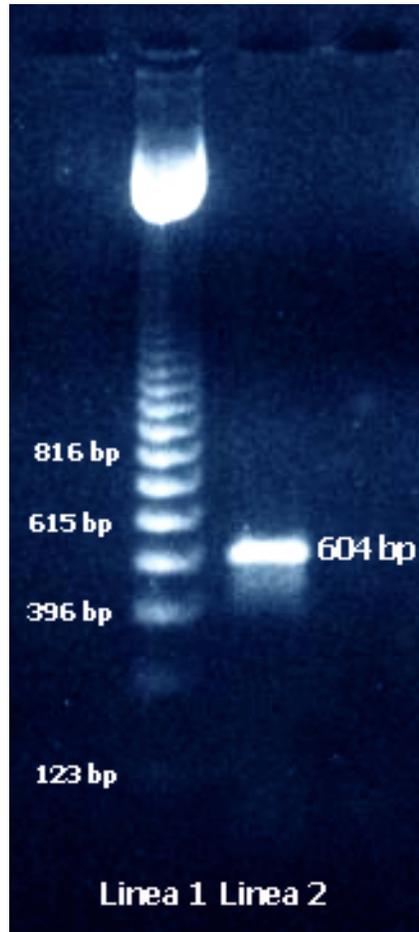


Figura 4. Amplificación de CMV. La Línea 1 marcador de peso molecular de 123pb (SIGMA), línea 2 banda de 604 bp en un gel de Agarosa 1.5%.

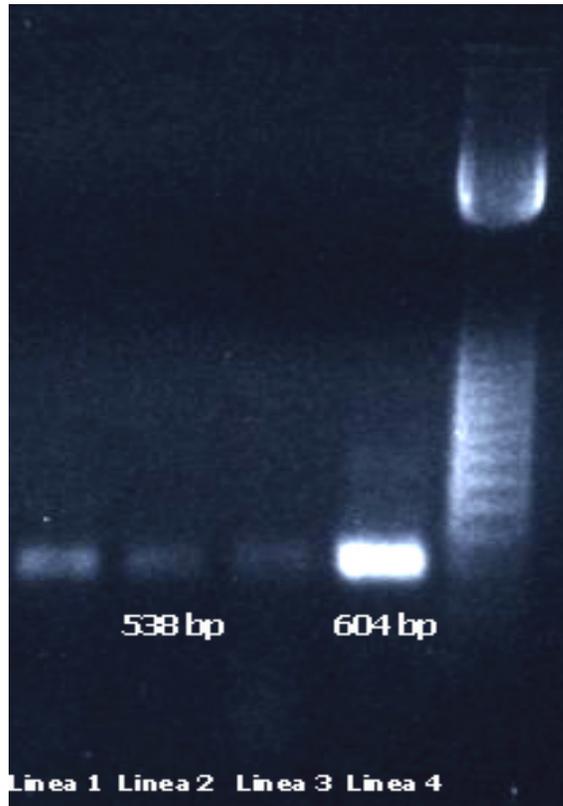


Figura 5. Amplificación de EBV y CMV, las líneas 1, 2 y 3 corresponden a la banda amplificada de 530 bp del EBV y la línea 4 corresponde a la banda amplificada de 604 bp de CMV

9.1 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Se realizaron diluciones seriadas de 20 ng/ul, 10 ng/ul, 1 ng/ul, 1 pg/ul, 500 fg/ul del ADN de CMV, estas diluciones se sometieron al protocolo descrito, dando positiva la concentración de 20 ng/ul. Se modificó el protocolo aumentando los ciclos de 3 a 6 y de 37 a 40, también se redujo 2°C la temperatura de hibridación de 60°C, y 1°C la temperatura de hibridación de 55°C, también se incremento la Taq polimerasa de 1 Unidad a 3 Unidades, una autoextensión de 5 segundos por ciclo a 72 °C de temperatura y se redujo el tiempo de hibridación de 1 minuto a 45 segundos en los 55°C, con el fin de aumentar la sensibilidad, pues según Innis y Gelfand (1990)³⁵ los ciclos entre 40 y 45 en PCR, son capaces de detectar un mínimo de 50 moléculas y la reducción de la temperatura de hibridación, el incremento de la Taq polimerasa y el aumento en el tiempo de la elongación favorece la sensibilidad; con estas adaptaciones en el protocolo se incremento de la sensibilidad a 500 fg/μl (Figura 6). 1 μg/μl ADN de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* se sometió a PCR con resultado negativo.

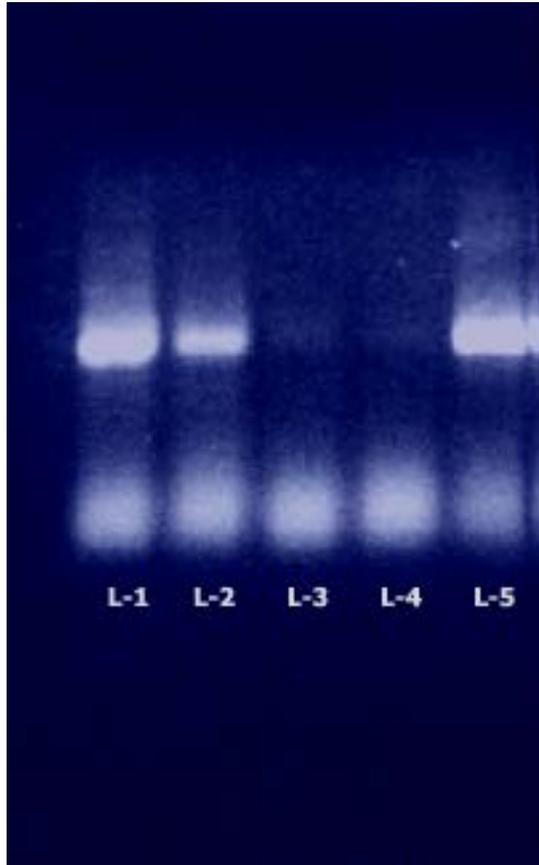


Figura 6. Prueba de sensibilidad, las líneas 1, 2, 3, 4 corresponden a amplificación con concentraciones de 10 ng/ul, 1 ng/ul, 1 pg/ul, 500 fg/ul respectivamente y la línea 5 corresponde al patrón de la corrida en un gel de Agarosa al 1,5%.

9.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las amplificaciones provenientes de cada ADN viral digeridas con enzimas de restricción, según el protocolo. El producto del PCR de CMV (una banda de 604 pb) se digirió con la enzima BstUI, esta enzima tiene nueve sitios cg/cg de corte los cuales están en los nucleótidos 164, 221, 233, 372, 383, 405, 483 y 511, resultando 10 bandas, de esas solo dos (de 164 y 139 pb) son visibles en un gel de agarosa, el resto de bandas pequeñas solo se ven en un gel fino de poliacrilamida (Figura 7).

El producto de PCR de EBV (una banda de 538 pb) se digirió con las enzimas BamHI y BstUI; la enzima BamHI tiene un solo sitio de corte en este fragmento en la posición 282 resultando dos fragmentos de 282 y 256 pb, la enzima BstUI tiene un solo sitio de corte en este fragmento, en la posición 280 resultando dos fragmentos de 280 y 258 pb visibles en un gel de Agarosa (figura 8).

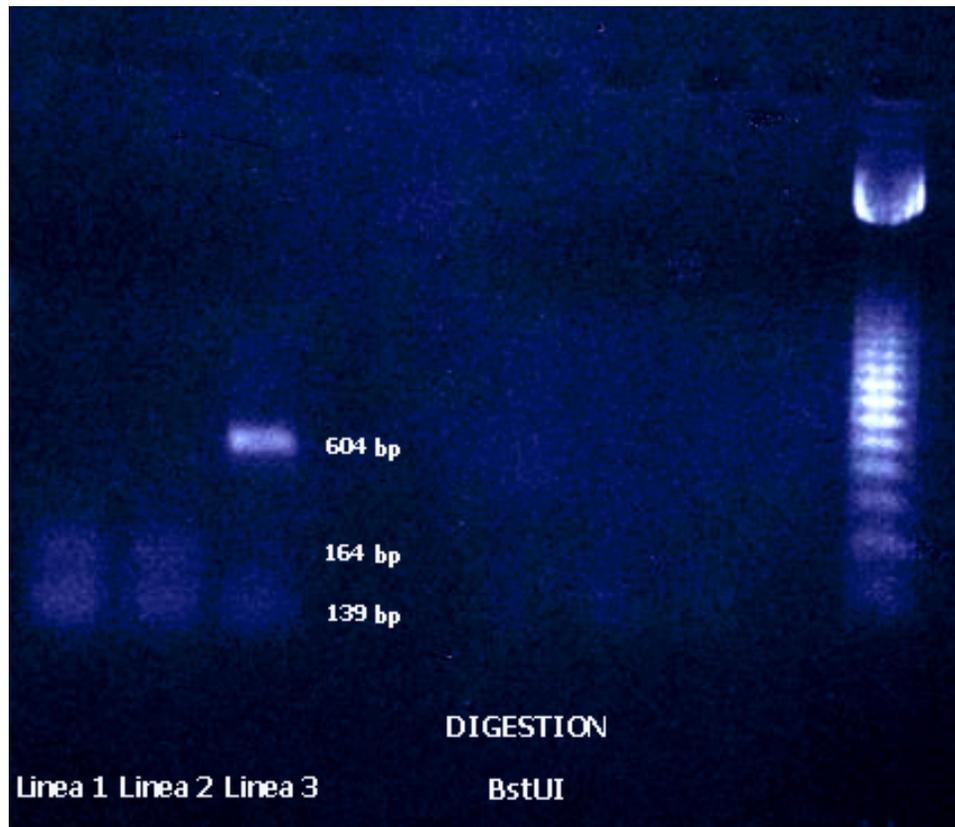


Figura 7. Digestión de las banda amplificada de CMV por la enzima BstUI. Las líneas 1 y 2 corresponden a los productos de digestión de 164 bp y 193 bp y la línea 3 corresponde a la banda de 604 pb del CMV en un gel de Agarosa 1.5%.



Figura 8. Digestión de la banda amplificada de EBV por las enzimas BamHI y BstUI. Las línea 1 y 4 corresponden a la amplificación de 538 bp del EBV, las líneas 2 y 3 corresponden a los productos de digestión con la enzimas BamHI y las líneas 5 y 6 corresponden a los productos de digestión con la enzima BstUI.

10. DISCUSIÓN

Este trabajo pretendió reproducir la técnica de PCR MÚLTIPLEX realizada en el año 2000 por Johnson Grant y colaboradores para adaptarlo a nuestro medio y poder realizar estudios posteriores en pacientes que podrían beneficiarse con esta prueba, porque detecta simultáneamente varios virus con patologías similares, complejas y algunos esquivos o difíciles de identificar, ejemplarizados por los virus Herpes tipo 6, 7 y 8, los cuales no tienen en nuestro medio una forma de laboratorio para su detección e identificación.

Para resumir este trabajo se tomaron como objeto de estudio, dos virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, el CMV y EBV. Para la estandarización y asegurar la positividad de las muestra, se partió de cultivos virales donados por el laboratorio de Microbiología de la Universidad del Valle y el FIDIC para asegurar la positividad de la muestra en el análisis por PCR.

A los cultivos virales se les extrajo el ADN con el método de proteinasa *K* y cloroformo alcohol isoamílico. Este protocolo es muy versátil aunque toma dos a tres días, tiene la ventaja de que se puede realizar en diferentes tipos de tejidos y muestras como de orina, biopsias en parafina y sin parafina, sangre, esputo y LCR. Con este protocolo se obtienen altas cantidades de ADN que van desde 1,5 µg/µl hasta 100 ng/ul aproximadamente.

Los primers escogidos fueron tomados del trabajo de Johnson Grant y colaboradores (2000), estos primers fueron diseñados para amplificar la región consenso **YGD TDS** del gen de la ADN polimerasa viral, este gen tiene 7 zonas altamente conservadas,³⁰ lo cual lo candidatiza para el diseño de los primers con este fin; este gen es utilizado en amplificación múltiple en otros trabajos.^{20,21,34.}

En el análisis de homologías (Disponible en Internet: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>>), ambos primers muestran 95% de similitud para CMV y 95% y 96% respectivamente para EBV. Estos primers amplifican secuencias muy similares entre si, que solo varían en su tamaño (604 pb en el CMV y 538 pb en el EBV).

El protocolo de Johnson (2000) se modificó con la intención de optimizar el PCR, incrementando el tiempo de hibridación en 55°C durante 1 minuto, se adicionó una auto-extensión de 5 segundos por ciclo. El aumento del tiempo en este paso incrementa el producto y la sensibilidad del PCR, aunque tiene la desventaja de

aumentar la probabilidad de amplificaciones inespecíficas,²² que en este caso no sucedió.

Otras adaptaciones al protocolo original se basan en el tiempo de la adición de la Taq polimerasa, en el trabajo de Johnson y colaboradores (2000) utilizaron la Taq Polimerasa Amplitag Gold de Perkim-Elmer, la cual se activa en los procesos de calentamiento por lo tanto esta Taq polimerasa tiene la facultad de soportar la temperatura de 95°C más tiempo que las Taq polimerasas convencionales. En este proyecto se trabajó con Taq polimerasa convencional de marca Promega, la cual se adicionaba a los 10 minutos de haber empezado el ciclo de desnaturalización a 95°C, porque en las especificaciones la Taq cuenta con una vida media de 40 minutos a 95°C. a partir de esta variación el PCR empezó a dar resultados positivos. Las diluciones seriadas de 20 ng/μl, 10 ng/μl, 1ng/μl 1 pg/μl, 500f g/μl, dieron como resultado una sensibilidad de 20 ng/μl.

Se modificó el protocolo en varios puntos con el objetivo de incrementar la sensibilidad en la prueba.

Primero: El número de ciclos, Innis y Gelfand (1990),³⁵ recomiendan incrementar a 40 y 45 ciclos con lo que se puede amplificar hasta 50 moléculas, de esta manera aumenta la sensibilidad; en la adaptación del protocolo los 3 primeros ciclos se aumentaron a 6 ciclos y los 37 ciclos restantes se aumentaron a 40 ciclos.

Segundo: Se incremento la Taq polimerasa de 1 unidad a 3, pues la eficiencia de la enzima aumenta con la concentración (algunas veces el exceso de enzima contenida en glicerol inhibe la amplificación).²² En este paso el aumento de Taq polimerasa no interfirió con la optimización.

Tercero: La disminución en la temperatura de hibridación afecta la actividad de los primers, elevando la sensibilidad en la prueba e intensificando la aparición de bandas inespecíficas³⁵

Para controlar estas variables, se realizaron tres cambios en la temperatura de hibridación:

En el protocolo de Johnson y colaboradores (2000), la temperatura inicial es 55°C, la cual se disminuyó a 45°C en 40 ciclos, obteniéndose una banda con poca resolución; posteriormente la temperatura se incremento hasta 50°C en 40 ciclos, obteniéndose una banda más definida pero sin sensibilidad.

La sensibilidad fue mayor cuando se incremento la temperatura a 54°C en 40 ciclos y 58°C en los seis primeros ciclos, este ultimo cambio de temperatura fue el que definitivamente produjo la sensibilidad esperada para este estudio

Cuarto: Buscando aumentar la sensibilidad en la actividad de la Taq polimerasa, para que complete la síntesis de todos los productos obtenidos con el paso progresivo de los ciclos, se disminuyo el tiempo de hibridación de 1 minuto a 45 segundos y se adicionó una auto-extensión de 5 segundos por cada ciclo a 72°C de temperatura de elongación durante los 40 ciclos finales.³⁵

Con estas adaptaciones al protocolo inicial se logró incrementar la detección del ADN viral a una concentración final de 500fg/μl.

En la optimización del PCR se intentó otro tipo modificaciones:

Como el incremento de la concentración del MgCl₂ de 5μl a 7μl puesto que el MgCl₂ actúa sobre la Taq Polimerasa y aumenta la asociación Primer-Hebra, de esta manera mejora la especificidad, la actividad y fidelidad de la enzima, pero en algunos casos el exceso del MgCl₂ afecta la intensidad en el producto del PCR inhibiendo la actividad de la Polimerasa.^{22,35} En este estudio el aumento en la concentración de MgCl₂ inhibió la actividad de la polimerasa.

También se elevó la cantidad de Primers, pues su incremento en concentraciones bajas de ADN ayuda a la sensibilidad de la prueba y al producto del PCR.³⁵ A la mezcla de PCR se le adiciono 6 μl de cada primer y 6 μl de MgCl₂ teniendo en cuenta que los primers actúan en presencia de este, captando iones Mg²⁺ en la asociación Primer-Hebra, esta adición en los Primers no causo algún efecto en el incremento de la sensibilidad, como resultado de este ensayo hubo amplificación pero no se incremento la sensibilidad.

No son necesario los adyuvantes en la mezcla de PCR, se obtuvieron iguales resultados con DMSO (dimetil sulfoxido) y sin DMSO, sin embargo en el proceso de sensibilidad de la prueba, el DMSO disminuía la sensibilidad, ya que este adyudante afecta la especificidad de la prueba y evita las amplificaciones inespecíficas.³⁵

Los fragmentos amplificados de 604pb para CMV y 538pb para EBV, inicialmente se sometieron a digestión con la enzima *BamHI* recomendada por Rozenberg y Lebon,¹ posteriormente Johnson y colaboradores para diferenciar estos dos fragmentos usaron la enzima *BstUI*, los fragmentos resultantes concuerdan con el análisis del programa Webcutter 2.0 y los presentados en la publicación de Johnson.

En el trabajo de Johnson, experimentaron esta técnica con muestras clínicas (como Fluido Cerebro Espinal, lesiones cutáneas, úlceras mucosas, sangre, fluidos broncoalveolares y biopsias), encontrando una correlación entre los resultados de exámenes serológicos y los hallazgos de PCR.

Con la estandarización y buenos resultados en la sensibilidad obtenidos en este estudio como son, la detección de ADN viral a una concentración final de 500fg/μl, la detección simultánea de dos tipos de virus de la familia *Herpesviridae* (CMV y EBV) y la identificación de estos virus usando las enzimas de restricción *BamHI* y *BstUI*, este estudio es un gran aporte en el campo clínico al permitir la identificación múltiple de los herpesvirus estudiados, además en nuestro medio es primera vez que un trabajo de investigación se enfoca con este objetivo.

Este proyecto es base a otro posterior, en el cual se validaran los resultados obtenidos usando muestras clínicas. Además se enfrentara esta técnica en su sensibilidad y especificidad contra otros métodos utilizados en la detección y diagnóstico de estos tipos de virus.

En conclusión, la estandarización de una técnica de cómo la PCR MÚLTIPLEX, trae consigo varios factores a tomar en cuenta como los mencionados anteriormente y la reproducción de una técnica ya desarrollada con resultados muy exitosos no siempre resulta tan fácil, puesto que los medios difieren de un lugar a otro.

11. CONCLUSIONES

Siendo los virus CMV y EBV objetos principales de estudio por su importancia clínica, este estudio pretendió optimizar la técnica de PCR MÚLTIPLEX desarrollada por Johnson Grant y colaboradores (2000) la cual busca la identificación simultánea de estos virus.

En la optimización de esta técnica se trabajó con ADN extraído de cultivos de CMV y EBV. Este ADN se sometió al protocolo adaptado a nuestras condiciones; una de las dificultades del estudio fue la baja sensibilidad de la prueba, por esta razón en la mayoría de los casos donde se colocó poca cantidad de ADN la prueba resultó negativa.

Con algunas modificaciones en el protocolo experimental se logró incrementar la sensibilidad hasta detectar 500fg/ μ l de ADN viral, así la técnica se pudo aplicar en nuestro medio, ahora es fundamental la aplicación de la técnica en casos clínicos para corroborar los datos. Se debe seguir trabajando en la estandarización de la técnica de PCR MÚLTIPLEX para la detección de los herpes virus restantes, pues este proyecto es básico para desarrollar otro proyecto que esta en vía de financiación por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, el cual pretende evaluar esta técnica en casos clínicos y enfrentarla a las pruebas de detección viral tradicionales (serologías y test de TZANK).

12. RECOMENDACIONES

Es importante mencionar que para estandarizar una técnica de Biología Molecular, particularmente el PCR, se deben explorar múltiples alternativas en el protocolo para conseguir el mejor resultado, así que en el PCR nunca se sabe lo suficiente, por lo tanto se cometen muchos errores, especialmente las personas novatas. Por los errores cometidos y para buscar correcciones, es digno mencionar algunas causas que hacen que el PCR no funcione, tomando como referencia, el artículo escrito por el señor Peter Frame titulado: "TEN THINGS THAT CAN KILL YOUR PCR".³⁶

1. Mucha cantidad de dNTP o los dNTP degradados. Gran cantidad de dNTP puede inhibir la reacción de PCR, también los dNTP son muy sensibles a los cambios de temperatura. Haciendo pequeñas alícuotas se puede disminuir el riesgo de dañar todo el reactivo.
2. No mezclar bien el $MgCl_2$
3. Mala concentración del $MgCl_2$, grandes cantidades de los iones de Mg^{2+} hacen que el PCR se inhiba o no haya buenas amplificaciones.
4. Los inhibidores en la reacción, después de una extracción, el ADN puede estar contaminado por Cloroformo, Fenol EDTA y SDS.
- 5 Pobre calidad del aceite mineral, este puede contener ciertas nucleasas, pero debe evitarse la esterilización por autoclave del aceite si es posible y no exponerlo a rayos UV.
6. Mucha cantidad de Enzima, el exceso de enzima en el PCR puede dar una mancha en el gel.
7. Mala concentración de los Primers, si se tiene poca concentración de los primers no hay amplificación, y si hay mucha cantidad de Primer hay dimerización de estos y no hay suficiente concentración de producto.
- 8 Mala programación en el Termociclador.
9. Exceso o insuficiente ADN puede afectar la amplificación.

10. Pobre diseño de los primers. El diseño de los primers es incierto puesto que es difícil sin la experimentación el evitar la complementariedad.

De las recomendaciones que hacen parte de la experiencia en este proyecto, se han de tener en cuenta: el pH del agua, que cuando no es el correcto inhibe la reacción, la contaminación de reactivos por mala manipulación y error en el momento de abrir los tubos, ya que el guante podía entrar en contacto con la boca del tubo y contaminarlo; y para finalizar se debe tener mucho cuidado en el manejo de las puntas, evitando que estas toquen otras superficies.

Conclusión.

Este proyecto pretende implementar la técnica de PCR MÚLTIPLEX para la detección de todos los 8 Herpes virus amplificando el gen de la polimerasa de ADN viral, que conserva gran homología estructural y funcional entre todos ellos, esta tesis logró la estandarización de la detección de CMV y EBV dos de los virus más problemáticos clínicamente. Esto demuestra que es posible desarrollar el PCR MÚLTIPLEX en nuestro laboratorio y debe seguir con la optimización de los restantes Herpes virus.

BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. Johnson, Grant et al. Comprehensive PCR-Based Assay for Detecion and Species Identification of human Herpesvirus. En: J. Clin. Microbiol. Vol 38, No 9. (Sept 2000); p. 3274-3279
2. Frias C, Matas L, Ferre X, Millan M, Marti S, Hernandez A, Ausina V.2001.Usefulness of adding multiplex nested-polymerase chain reaction asay of cerebrospinal fluid samples to routine diagnostic testing for herpesvirus encephalitis. 20(99:670-672.
3. Gabe Mirkin, M.D. CMV And Heart Attacks <http://www.drmirkin.com/heart/html>
4. Harrison´s Principles of Internal Medicine. New York, McGraw-Hill. 15th Edition. 2001.
5. Lafacu.Diabetes mellitus;http://www.lafacu.com/apuntes/medicina/diabe_melli/
6. Nieto J, Solier P, Cosmtock G, Wu K, Adam E, Melnick J, Szklo M.Cytomegalovirus Infection, Lipoprotein(a), and Hypercoagulability: An Atherogenic Link? En Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.;17:1780-1785. 1997
7. A Ascherio, KL Munger, ET Lennette, D Spiegelman, MA Hernan, MJ Olek, SE Hankinson, DJ Hunter.Epstein-Barr Virus Antibodies and Risk of Multiple Sclerosis. A Prospective Study. En Journal of the American Medical Association Dec 26;286(24):3083-3086.2001
8. Hoang MP , Dawson DB , Rogers ZR,Scheuermann RH , Rogers BB.Polymerase chain reaction amplification of archival material for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus6, and parvovirus B19 in children with bone marrow hemophagocytosis.Hum Pathol 1998 Oct;29(10):1074-1077
9. James JA ,Kaufman KM ,Farris AD ,Taylor-Albert E ,Lehman TJA ,Harley JB .An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus En.J Clin Invest Dec;100(12):3019-3026.1997
10. TokuraY , Ishihara S ,Tagawa S , Seo N ,Ohshima K , Tajigawa M .Hypersensitivity to mosquito bites as the primary clinical manifestation of a juvenile type of Epstein-Barr virus-associated natural killer cell leukemia/lymphoma.En J Am Acad Dermatol Oct;45(4):569-578.2001
11. Bellas C., Santón A., Plaza., Virus Epstein Barr y Neoplasia. Laboratorio de Patología Molecular, Hospital Ramón y Cajal.

<http://www.conganat.org/lnfo.tortosa/conf/cap2/gralidad.htm#Estructura%20del%20VEB>

12. Picazo, Juan et al. Virus Herpes 1, 2, 6, 7, y 8: Protocolos Clínicos de Diagnostico Serológico Comentado. No 10. Versión 1.0.(Noviembre 1999); p.1 - 12)
13. Quereda C., Corral I., Laguna F., Valencia et al. 2000. Diagnostic Utility of a Multiplex Hepersvirus PCR assay peerformed with Cerebrospinal Fluid From Human Inmmnodeficiency Virus-infected Patients With Neurological Disorders. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:3061-3067
14. Robert PY, Traccard I, Adenis JP, Denis F, and Ranger-Rogez S. 2002. Multiplex detection of Herpesviruses in tear Fluid using the "stair primer" PCR method: prospective study of 93 patients. 2002. *J Med Virol*. 66(4):506-511
15. Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, and Klapper P. 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiology Reviews*. 31:559-570.
16. Aberle S. W. And Puchhammer-Stockl E. 2002. Diagnosis of Herpesvirus Infections of the central nervous system. *J. Clin Virology*. 25:79-85
17. Cabeda J., Castro A., Amorim M., et al. 2002. Detecction of Herpesvirus Infection of the CNS: the experience of hospital General de Santo Antonio. En *Journal of Clinicla Virology*. 25:53-57
18. Cassinotti P, Mietz H and Siegl G. 1996. Suitability and Clinclal application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes virus infections. *J Med Virol*. 50(1):75-81
19. Fortunato E, Spector D. 1999 Regulation of Human Cytomegalovirus Gene Expression. *Advances in virus research* Vol 54 pg 61-127)
20. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, nad Kourea-kremastinou J. 2001. Laboratory Diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a Muliplex PCR Assay. *J. Clin Microbiology*. 39:4426-4432
21. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, and Colimon R. 1999. Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J. Clin. Microbiology*. 37:950-953
22. Octavian Henegariu, PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting. (Yale University). <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>
23. SIA, Irene, PATEL, Robin. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-organ Transplant Recipients. En: *Clinical Microbiology*. Vol 13. No 1. (Enero 2000); p 83-121.
24. Wyatt J., McCaughey C., O'Neil HJ., Coyle PV. Nested Muliplex polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous herpes simplex and herpes zozter infections and a comparision with electromicroscopy. En *J Med Virol* 2001 Jan; 63(1):52-6

25. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, nad Kourea-kremastinou J. 2001. Laboratory Diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a Multiplex PCR Assay. *J. Clin Microbiology*. 39:4426-4432
26. Steven J. Read, Joannel L. Mitchell nad Colin G. FinK. 2001. Linght Cyler Multiplex PCR for the Laboratory Diagnosis Of Common Viral Infectosn of the Central Nervous System. *Journal of Clinca Microbiology*. Sept p3056-3059
27. Emery, Vincent. *Viral Dynamic During Active Cytomegalovirus infection and Pathology : Diagnostics and Antiviral Therapy. Part II En: Intervirology. Vol 42 (1999); p. 405-411.*
28. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *En: J Clin Pathol. Vol 54 (2001); p. 84-88.*
29. Perez J., Navarro M., Cardona C., Montero J. 1995. Diagnóstico De Laboratorio De Las Infecciones Por Herpesvirus. procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) [http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/ .htm](http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/)
30. Andrei, G. Snoeck, R. De Clercq E. Esnouf, R. Fiten, P. Opdenakker, G. Resistance Of Herpes Simplex Virus Type 1 Against Different Phosphosnylmethoxyalkyl Derivates Of Purines And Pyrimidines Due To Specific Mutations In The Viral Dan Polymerase Gene. *Journal Of General Virology. Vol 81, P 639-648; 2000.*
31. Karp Gerald. *Cell and Molecular Biology. segunda edición. Canada: John Wiley & Sons, Inc. 1999 811-81*
32. Druce J., Catton M., Chibo D., Minerds K., Tysen D., Kostecki R., and Maskill B. 2002. Utility of a Multiplex Pcr Assay for Detecting Herepesvirus DNA in Clincla samples. *J. Clin. Microbiolgy. 40:1728-1732.*
33. Dabil H, Boley ML, Schmitz TM, Van Gelder RN. Validation Of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for infectious posterior uveitis. 2001. *Arch Ophthalmol. 119(9):1315-1322*
34. Minjolle Sophoie, Arvieux C., Gautier A.L., et al. 2002. Detection of Herpesvirus genome by polynerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. *Journal of Clinicla Virology. 25:59-70*
35. Coyne et al. *PCR primer Design and Reaction Optimization: Molecular Biology Techniques manual. 3ed. Copyright, 1992, 1996, 2001. p.1-13 <http://web.uct.ac.za/microbiology/pcroptim.htm>*
36. Frame Peter. Ten Things That Can Kill Your PCR. http://www.biowire.com/nucleus/nucleus_1_1.jsp

BIBLIOGRAFÍA

Aberle S. W. And Puchhammer-Stockl E..Diagnosis Of Herpesvirus Infections Of The Central Nervous System. EnJ. Clin Virology 25:79-85. 2002

A Ascherio, KL Munger, ET Lennette, D Spiegelman, MA Hernan, MJ Olek, SE Hankinson, DJ Hunter.Epstein-Barr Virus Antibodies and Risk of Multiple Sclerosis. A Prospective Study.EnJournal of the American Medical Association Dec 26;286(24):3083-3086.2001

Andrei, G. Snoeck, R. De Clercq E. Esnouf, R. Fiten, P. Opdenakker, G. Resistance Of Herpes Simplex Virus Type 1 Against Different Phosphosnylmethoxyalkyl Derivates Of Purines And Pyrimidines Due To Specific Mutations In The Viral DNA Polymerase Gene.En Journal Of General Virology. Vol 81, P 639-648; 2000

Bellas C., Santón A., Plaza., Virus Epstein Barr y Neoplasia. Laboratorio de Patología Molecular, Hospital Ramón y Cajal. <http://www.conganat.org/linfo.tortosa/conf/cap2/gralidad.htm#Estructura%20del%20VEB>

Calvario A,Bozzi A,Scarasciulli M, Ventola C,Seccia R,Stomati D, Brancasi B.Herpes Consensus PCR Test: A Useful Diagnostic Approach To The Screening Of Viral Diseases Of The Central Nervous System. En.J Clin Virol. 25:1728-1732. 2002

Cabeda J., Castro A.,Amorim M., et al. Detecction of Herpesvirus Infection of the CNS:The Experience Of Hospital General De Santo Antonio. En Journal of Clinicla Virology.25:53-57 2002

Cassinotti P,Mietz H and Siegl G..Suitability and Clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes virus infections. J Med Virol. 50(1):75-8. 1996

Coyne et al. PCR primer Design and Reaction Optimization: Molecular Biology Techniques manual. 3ed. Copyright, 1992, 1996, 2001. p.1-13 <http://web.uct.ac.za/microbiology/pcroptim.htm>

Dabil H, Boley ML, Schmitz TM, Van Gelder RN.Validation Of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction assay for infectious posterior uveitis. En Arch Ophthalmol.119(9):1315-1322.2001

Druce J., Catton M., Chibo D., Minerds K., Tysen D., Kosteci R., and Maskill B. Utility of a Multiplex PCR Assay for Detecting Herpesvirus DNA in Clinical samples. En J.Clin.Microbiolgy.40:1728-1732. 2002

Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, and Klapper P.. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology.En Clin Microbiology Reviews. 31:559-570. 2000

Emery, Vincent. Viral Dynamic During Active Cytomegalovirus Infection And Pathology : Diagnostics and Antiviral Therapy. Part II En: Intervirology. Vol 42 p. 405-411. 1999

-----Investigation of CMV disease in immunocompromised patients.
En: J Clin Pathol. Vol 54 p. 84-88. 2001

Fortunato E, Spector D. Regulation of Human Cytomegalovirus Gene Expression. En Advances in virus research Vol 54 pg 61-127 1999

Frame Peter. Ten Things That Can Kill Your PCR. <http://www.biowire.com/>

Frias C, Matas L, Ferre X, Millan M, Marti S, Hernandez A, Ausina V. Usefulness Of Adding Multiplex Nested-Polymerase Chain Reaction Assay Of Cerebrospinal Fluid Samples To Routine Diagnostic Testing For Herpesvirus Encephalitis.En J Clin Microbiol Infect 20 99:670-672. 2001

Gabe Mirkin, M.D.Cmv And Heart Attacks.
<http://www.drmirkin.com/heart/1685.html>

Harrison's Principles of Internal Medicine. New York, McGraw-Hill. 15th Edition. 2001.

Hoang MP , Dawson DB , Rogers ZR,Scheuermann RH , Rogers BB.Polymerase chain reaction amplification of archival material for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus6, and parvovirus B19 in children with bone marrow hemophagocytosis.Hum Pathol 1998 Oct;29(10):1074-1077

James JA ,Kaufman KM ,Farris AD ,Taylor-Albert E ,Lehman TJA ,Harley JB .An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus En.J Clin Invest Dec;100(12):3019-3026.1997

Johnson, Grant et al. Comprehensive PCR-Based Assay for Detecion and Species Identification of human Herpesvirus. En: J. Clin. Microbiol. Vol 38, No 9.; p. 3274-3279. 2000.

Karp Gerald. Cell and Molecular Biology. Segunda Edición. Canada:John Wiley & Sons, Inc.1999 811-812p

Lafacu.Diabetesmellitus;http://www.lafacu.com/apuntes/medicina/diabe_mell/

M. Mar, Rhiju Das et al. Genomewide Function Conservation and phylogeny in the Herpeviridae.En: Genome research.11:43-54. 2001

Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N,Plakokefalos E, Tzanakaki G, nad Kourea-kremastinou J.. Laboratory Diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a Multiplex PCR Assay.En: J. Clin Microbiology.39:4426-4432. 2001

Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, and Colimon R..Amplification of the six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR.En: J. Clin. Microbiology. 37:950-953. 1999

----- Arvieux C.,Gautier A.L., et al..Detection of Herpesvirus genome by polynerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. En: Journal of Clinicla Virology.25:59-70. 2002

Nieto J, Solier P, Cosmtock G, Wu K, Adam E, Melnick J, Szklo M.Cytomegalovirus Infection, Lipoprotein(a), and Hypercoagulability: An Atherogenic Link?EnArteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.;17:1780-1785. 1997

Octavian Henegariu, PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting.(YaleUniversity).<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.htm>

OHGA, Shouichi et al. Epstein-Barr Virus (EBV) load and Cytokine Gene Expression in Activated T Cells of Chronic Active EBV Infection. En : The journal Of Infectious Diseases. Vol 183 p. 1-7. 2001

Perez J.,Navarro M.,Cardona C.,Montero J.. Diagnóstico De Laboratorio De Las Infecciones Por Herpesvirus. procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) 1995 .<http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/> .htm
Picazo, Juan et al. Virus Herpes 1, 2, 6, 7, y 8: Protocolos Clinicos de Diagnostico Serologico Comentado. No 10. Versión 1.0.(Noviembre 1999); p.1 - 12)
<http://www.fei.es/protocol>

Quereda C., Corral I., Laguna F., Valencia et al. Diagnostic Utility of a Multiplex Herpesvirus PCR assay performed with Cerebrospinal Fluid From Human Immunodeficiency Virus-infected Patients With Neurological Disorders. En: Journal of Clinical Microbiology. 38:3061-3067. 2000

Robert PY, Traccard I, Adenis JP, Denis F, and Ranger-Rogez S. 2002. Multiplex detection of Herpesviruses in tear Fluid using the "stair primer" PCR method: prospective study of 93 patients. 2002. J Med Virol. 66(4):506-511

Sia, Irene, Patel, Robin. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-organ Transplant Recipients. En: Clinical Microbiology. Vol 13. No 1.; p 83-121. 2000

Spencer, Juliet et al. Structure of the Herpes simplex Virus Capsid: Peptide A862-H880 of the Major Capsid Protein on the rim of the Capsomer Protrusions. En: Virology. Vol 228 No. VY968392. p. 229-235. 1997

Steven J. Read, Joannel L. Mitchell nad Colin G. FinK.. Light Cycler Multiplex PCR for the Laboratory Diagnosis Of Common Viral Infections of the Central Nervous System. En: Journal of Clinical Microbiology. Sept p3056-3059. 2001

Tang Y, Johnson Y, Browning P, Cruz-Gervis R, Davis A, Graham B, Brigham K, Oates J., Loyd J, Stecenko A. Herpesvirus DNA Is Consistently Detected in Lungs of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. En JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 2633-2640. 2003

Tokura Y, Ishihara S, Tagawa S, Seo N, Ohshima K, Tajigawa M. Hypersensitivity to mosquito bites as the primary clinical manifestation of a juvenile type of Epstein-Barr virus-associated natural killer cell leukemia/lymphoma. En J Am Acad Dermatol Oct; 45(4):569-578. 2001

Wyatt J., McCaughey C., O'Neil HJ., Coyle PV. Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction For The Diagnosis Of Cutaneous Herpes Simplex And Herpes Zoster Infections And A Comparison With Electromicroscopy. En J Med Virol ; 63(1):52-6. 2001.

ANEXO A

Secuencia del gen de la ADN polimerasa de Citomegalovirus (CMV)

**HCMV.M14709.1 HS5POL 2808-3405
604 base pairs**

Graphic map | Table by enzyme name

gtgttcgactttgccagcctctacccttccatcatcatgcccacaacctctgctactccacctgctgggtgccg base pairs
cacaagctgaaacggtcggagatgggaaggtagtagtaccgggtgttgagacgatgaggtgggacgaccacggc 1to75

ggtggcgagtacctgtggaccccgccgacgtatacagcgtcacgctagagaacggcggtgaccaccgctttgtg base pairs
ccaccgctcatgggacacctggggcgctgcatatgtcgagtgcgatccttgccgcaactgggtggcgaaacac 76to150

BstUIBstUI

cgtgcttcgggtcgcgctctcggtgctctcggaactgctcaacaagtgggtttcgagcggcggtgcccgtgcgcgaa base pairs
gcacgaagccacgcgacagaccagagagccttgacgagttgttaccctaaagcgtcgccgacgacgacgctt 151to225

BstUI

tgcattgctgagtgtaagacctgtgcccgtatgctgctcgacaaggaacagatggcgctcaaagtaacgtgc base pairs
acgtacgctcacagttctgggacacgcgcatatgacgagctgttccttctaccgagtttcattgcaac 226to300

BstUI

aacgctttctacggtttaccggcggtgcaacggatgatgcccgtgctgcccacgcccagcatcacgcg base pairs
ttgcaaaagatgcaaaatggccgaccagttgcccatactacggcacagacgggtagcggcggtcgtagtcgcg301to375

BstUIBstUI

atcggtcgacatgctagagcgcacggcggttcatcaaagacaacttttcagagccggtgtttttgcaaat base pairs
tagccagcgtgtacgatctcgctgcccggccaagtgttctggtgaaaagtctcggcacaacacacgctgta 376 to 450

BstUIBstUI

tttttaacaggaagactatgtagtggaacgccccgggaggggattcggaggagagcagcgggttaccggagggg base pairs
aaaaaattagtccttctgatacatcacccttgcgcccctcccctaagcctcctctcgtcgcgcaatggcctccc 451 to 525

BstUI

ctcgaacatcgtcagggggctcgaacgaacggcggtggagggcggggtcatctacggggacacggacagcgtg base pairs
gagctttgtagcagtcccccgagcttcttgcgcccacctcgcgcccagtagatgccctgtgctgtgctgcaac 526 to 600

tttg base pairs
aac 601 to 604

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
BstUI	9	164 221 233 372 383 405 483 511 570	cg/cg

ANEXO B

Secuencia del gen para la ADN polimerasa de Epstein-Barr (EBV)

EBV .V01555.1 regiones 154474-155003

538 base pairs

Graphic map | Table by enzyme name

taaacagcagtcggtgccccgtagatgactcgaagctggccctcggggttgagggcgcccaggcgtccggg base pairs
atgtgctcagggcacagggcatctactgagcttcgaccggagccccaactccccgagggtccgcaggcccc 1 to 75

agggggccagggcctgcaggttggcggggctcagggcctccacgaaggccttggcccgcctccaacatcgtgcggc base pairs
tccccgggtcccgagctccaaccgccccgagtcgggaggtgcttcgggaaccggcgaggtttagcacgccc 76 to 150

cctgcagcgtcaccgtctcggcgatggagagggcagggaaagagggccttggccaccggggaagccgtagacgg base pairs
ggacgtcgcagtgccagagccgctacctctcgcctccttctcggcaaccggggggcacttcggcatctgcc 151 to 225

BstUI

cgttgcacgtgcacttgatggccagctgctgcttgctcgaggatggctcctttggcgggatcctcgcaggccgcca base pairs
gcaacgtgcacgtgaactaccggctgcagcgaacagctcctaccaggaaaccgcccctaggagcgtccggcgg 226 to 300

gcagcttcttgatggccttgctgcttggccagccaggaggtcaacagactagccaagaaggactcgtgcacgtgct base pairs
cgtcgaagaactaccggaacggaaccggctcctccagttgctgatcggttcttctcctgagcagcgtgcacga 301 to 375

tctttacaaagtggtagacgcccccgtagcctgaaggactcatagcttctccccggcgaggccgggtagcc base pairs
agaaatgtttcaccatctcggggggcactcggacttctcctgagatcagaagagggcccgcgtccggccgatcgg 376 to 450

tgtgctcttctccccggcgttatcatggtagaataacagagattatgagcctgaatgatgctcgggtagaggctgg base pairs
acacgagaagagggccgcaatagtagcatcttattgtctctaataactcggacttactacgagccccatctccgacc 451 to 525

caaagtcaccac base pairs
gtttcaggtggtg 526 to 538

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
BstUI	1	280	cg/cg

Every enzyme analyzed cuts this sequence.

ANEXO C

Secuencia del gen para la ADN polimerasa de Epstein-Barr (EBV)

EBV .V01555.1 regiones 154474-155003

538 base pairs

Graphic map | Table by enzyme name

taaacagcagtcggtgccccgtagatgactcgaagctggccctcggggtgagggcgcccagcgtccggg base pairs
at ttgtcgctcaggcacagggcatctactgagcttcgaccgggagccccaaactccccggggtccgcaggcccc 1 to 75

agggggccaggcctgcaggttggcggggctcagggcctccaagaaggccttggcccgtccaacatcgtgcggc base pairs
tccccgggtcccgagctccaaccgccccgagtcccggaggtgcttcggaaaccggcgaggtttagcacgccg 76 to 150

cctgcagcgtcacctctcggcgatggagaggcagggaaagaggccgttggccaccgggtgaagccgtagacgg base pairs
ggacgtcgcagtgagcagccgctacctctccgctccctttctccggcaaccgggtggggccacttcggcatctg cc 151 to 225

BamHI

cggtgcagcgtcacttgatggccagctgctgcttgcgaggatggtcctttggcgcgatcctcgcaggccgcca base pairs
gcaacgtgcagctgaactaccggctcgcagcgaacagctcctaccaggaaaccgcgctaggagcgtccggcggt 226 to 300

gcagcttcttgatggccttgcttggccagccaggaggtcaacagactagccaagaaggactcgtgcacgtgct base pairs
cgtcgaagaactaccggaacgcgaaccggctcggctcctccagttgctgacggttcttctcctgagcacgtgcacga 301 to 375

tctttacaaagtggtagacgcccccgtagcctgaaggactcatagtcttctcccggcgagccgggctagcc base pairs
agaaatgtttcaccatctgcggggggcactcggacttctcgtagatcagaagagggcccgcgtccggccgatcgg 376 to 450

tgtgctcttctcccggcgttatcatggtagaataacagagattatgagcctgaatgatgctcgggtagaggctgg base pairs
acacgagaagagggcccaatagtagtaccatcttattgtctctaatactcggacttactacgagcccatctccgacc 451 to 525

caaagtccaccac base pairs
gtttcaggtggtg 526 to 538

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
BamHI	1	282	g/gatcc

Every enzyme analyzed cuts this sequence.