

29/85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"IDENTIFICACION DE ANTICUERPOS PARA
ANTIGENO TEMPRANO Y ANTIGENO
CAPSULAR DEL VIRUS EPSTEIN-BARR POR
INMUNOFLUORESCENCIA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

SILVIA RENDON ROMERO



FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

-INDICE

| | |
|---|----|
| 1.- Resumen | 1 |
| 2.- Introducción | 2 |
| 2.1.- Morfología y Epidemiología del Virus Epstein-Barr | 2 |
| 2.2.- Antígenos del Virus Epstein-Barr | 5 |
| 2.2.1.- Antígeno Nuclear del Virus Epstein-Barr | 6 |
| 2.2.2.- Antígeno de Membrana | 6 |
| 2.2.3.- Antígeno Temprano | 7 |
| 2.2.4.- Antígeno Capsular | 8 |
| 2.3.- Expresión de antígenos en líneas celulares portadoras del Virus Epstein-Barr | 9 |
| 2.4.- Respuesta Inmunológica | 10 |
| 2.5.- Interpretación de anticuerpos séricos inducidos por Virus Epstein-Barr | 11 |
| 3.- Fluorescencia | 14 |
| 3.1.- Inmunofluorescencia | 15 |
| 4.- Formas de diagnóstico | 18 |
| 5.- Planteamiento del problema | 19 |
| 6.- Objetivos | 20 |
| 7.- Metodología | 21 |
| 7.1.- Obtención de sueros | 21 |
| 7.2.- Determinación de anticuerpos IgM contra antígeno capsular | 21 |
| 7.2.1.- Preparación de laminillas para IF | 22 |
| 7.2.2.- Dilución y adsorción del suero problema | 23 |

| | | |
|---------|---|----|
| 7.3.- | Determinación de anticuerpos IgG contra antígeno temprano | 24 |
| 7.3.1.- | Preparación de laminillas para IF | 24 |
| 7.3.2.- | Manejo de sueros | 25 |
| 8.- | Resultados | 27 |
| 9.- | Análisis y discusión | 41 |
| 10.- | Conclusiones | 45 |
| 11.- | Bibliografía | 47 |
| 12.- | Apendice | 52 |

1.-RESUMEN

El Virus Epstein-Barr (VEB), pertenece al grupo de los Herpesvirus, está integrado por 162 capsómeros con una envoltura de naturaleza lipoprotéica que da al virus un diámetro aproximado a los 150 nm. Su material nucleico es una doble cadena de DNA. Produce infección durante la infancia, la cual puede cursar asintomática o puede desarrollar Mononucleosis Infecciosa. La vía de infección es a través de la saliva. Una de las razones por las que se realiza este estudio, se debe a la permanencia crónica que tiene el virus en el huésped una vez infectado, por lo que está propenso a una reinfección.

En la actualidad existen diferentes metodologías para la detección de anticuerpos contra VEB la mayoría presentan inconvenientes en cuanto a costo, tiempo de realización, infraestructura, sensibilidad y especificidad. Tradicionalmente la detección del anticuerpo heterófilo había sido la base para el diagnóstico de Mononucleosis Infecciosa o de otros síndromes asociados a este virus. Nosotros proponemos la identificación de anticuerpos contra antígeno Capsular y Temprano por el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la cual aumenta considerablemente la sensibilidad y especificidad diagnóstica, para tal objetivo se muestrearon 209 sueros y 19 líquidos cefalorraquídeos de pacientes con diagnóstico clínico de infección por VEB, como sustrato se utilizaron células RAJ1 y P3HR-1, revelándose con un segundo anticuerpo fluorescente. Los resultados positivos obtenidos fueron:

Para los sueros: Ag. Capsular 51 %, Ag. Temprano 82 %.

2.-INTRODUCCION

2.1.-MORFOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DEL VIRUS EPSTEIN-BARR.

El Virus Epstein-Barr pertenece al grupo de los Herpesvirus esta integrado por: nucleocapside de simetría icosaédrica con 162 capsómeros, los cuales tienen la forma de prismas elongados hexagonales o pentagonales con un hueco central. Esta estructura está cubierta con una envoltura de naturaleza lipoproteica que da al virus un diámetro aproximado a los 150 nm. Pueden existir formas desnudas de 100 nm. y en algunas ocasiones presentan doble envoltura, (Epstein, 1979).

El material nucleico que tiene este virus es DNA de doble cadena con peso molecular de 1.0×10^7 daltons, (Schulte-Holthausen, 1970).

La vía de infección más común del VEB es a través de la saliva, llevándose a cabo la primera replicación viral en el epitelio faríngeo, (Sixbey, 1984). De esta primera replicación los viriones pasan a torrente sanguíneo para infectar de manera selectiva los linfocitos B, ya que estas células poseen receptores específicos para este virus en su superficie, (Jondal, 1973). Durante la enfermedad los linfocitos son infectados por el virus y pueden seguir siendo infectados de manera permanente aunque el cuadro clínico desaparezca.

En la actualidad, los avances en la investigación clínica epidemiológica colocan al VEB como uno de los agentes virales patógenos causales de Mononucleosis Infecciosa (MI), Carcinoma Nasofaríngeo (CNF), Linfoma de Burkitt (L.B).

Los estudios seroepidemiológicos realizados hasta la fecha revelan que un alto porcentaje de las enfermedades por VEB se producen en niños menores de 6 años y la producción de anticuerpos contra el VEB se inicia a partir de la primoinfección.

Usualmente la infección primaria tiene un curso asintomático o bien puede presentar manifestaciones clínicas no muy específicas, semejantes a otras infecciones virales que afectan vías respiratorias, sistema nervioso central, hígado, riñón o neoplasias. Se ha observado que la prevalencia puede aumentar hasta un 80 % después de los 30 años de vida, (Sumaya, 1975).

Cuando la infección se presenta durante la adolescencia o en adultos jóvenes, el cuadro más común de la infección se manifiesta en el 50 % de los casos como Mononucleosis Infecciosa, (Niederman, 1970). Después de una infección primaria la cual puede cursar sintomática o asintóticamente se produce seroconversión hacia la cual no contrarresta la infección tisular, puesto que la infección viral se produce en forma perenne en el hospedero. La presencia del virus en el hospedero da lugar a la infección latente No Productiva en la que se encuentra un número reducido de linfocitos B infectados

circulando, o bien manifestarse una Infección Productiva, con un foco infeccioso en nasofaringe, con liberación de viriones en el fluido bucal, esto da lugar a una transmisión horizontal con los que tuvieron contacto con el primer caso. (Epstein, 1979).

El periodo de incubación del VEB causante de MI es largo, de cinco a siete semanas, sin embargo si la vía de infección se produce por transfusión sanguínea, el periodo de incubación se acorta a tres semanas. Las manifestaciones clínicas de MI en adultos jóvenes generalmente son: fiebre, faringitis, hepatomegalia, esplenomegalia, alteraciones de las funciones hepáticas, linfocitos atípicos en un 25 %. El curso clínico de la MI puede manifestarse de la siguiente manera:

| | | | | |
|--------------------------|----|---|-----|----------|
| Fase aguda | 0 | - | 3 | semanas. |
| Fase convaleciente | 4 | - | 8 | semanas. |
| Fase latente | 9 | - | 28 | semanas. |
| Fase crónica | 29 | o | más | semanas. |

El resultado de estudios seroepidemiológicos revelan que la forma latente del genoma viral puede encontrarse en cultivos de linfocitos de sangre periférica de individuos con el antecedente de haber padecido MI, también puede identificarse en secreciones orofaríngeas del 15 % de individuos en los cuales nunca hubo sintomatología.

La relación entre las células y el VEB en una infección aguda primaria como se menciona anteriormente, se origina a través de la vía oral y hay evidencias muy fuertes que marcan

que la replicación viral inicial no es en linfocitos B, ya que existe un tipo particular de epitelio faríngeo con células que tienen receptores específicos para VEB, (Sixbey, 1984). Esto fue demostrado *in vitro* por medio de cultivo con líneas celulares linfoblastoides de cordón fetal, estas son transformadas por el VEB obtenidos del lavado faríngeo de pacientes con MI, (Gerber, 1972, Miller, 1973, Morgan, 1979).

2.2.-ANTIGENOS DEL VIRUS EPSTEIN-BARR

Se han identificado cuatro antígenos con diferencias en: especificidad serológica, localización celular y expresión durante el ciclo de replicación viral, a los que universalmente se les ha catalogado de la siguiente forma:

- ANTIGENO NUCLEAR (EBNA) Reedman y Klein., 1973.
- ANTIGENO DE MEMBRANA (MA) Klein, 1966.
- ANTIGENO TEMPRANO (EA) Henle., 1970.
- ANTIGENO CAPSULAR VIRAL (VCA) Henle y Henle., 1966.

Una de las respuestas del organismo ante el VEB es la formación de anticuerpos específicos contra los diferentes marcadores antigénicos, dependiendo de la evolución del padecimiento.

2.2.1.-ANTIGENO NUCLEAR DEL VIRUS EPSTEIN-BARR (EBNA) .

7 5

Tiene un peso molecular estimado entre 4.8×10^7 a 2×10^8 daltons, (Pearson, 1980) de naturaleza polipeptídica y están presentes como una estructura tetramérica con la capacidad de fijar complemento, (Liabeuf, 1975).

En líneas celulares infectadas con VEB, la síntesis de EBNA precede en apariencia la síntesis de DNA celular, esto indica que EBNA es producto de una función autónoma del genoma viral, ya que se expresa independientemente del control celular o viral que limita la producción de otros determinantes antigenicos virales como MA, EA y VCA (Einher-Ernberg, 1978).

Todas las células linfoblastoides humanas infectadas con VEB expresan EBNA, estas pueden ser detectadas por medio de inmunofluorescencia anticomplementaria, (Reedman y Klein, 1973).

2.2.2.-ANTIGENO DE MEMBRANA (MA).

Este antígeno es expresado en la membrana de células linfoblastoides viables que soportan la replicación de partículas virales, (Pearson, 1980) y es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes, (Pearson, 1970, 1971, Pearson y Qualliere, 1978).

Son tres glicoproteínas diferentes, el peso molecular respectivo a cada grupo es: 300-350, 200-250 y 85-90 daltons, (Thorley-Lawson, 1982).

Yata 1970, ha demostrado que la síntesis de MA puede ser bloqueada por proteínas resultantes de la síntesis de RNA, en cuanto a los inhibidores de síntesis de DNA no interfieren con la síntesis de este antígeno.

El suero anti-MA presenta 1, 2 o 3 anticuerpos específicos lo que confirma que el antígeno de membrana presenta el Antígeno Temprano de Membrana (EMA) formado después de la síntesis de DNA y el Antígeno de Membrana Latente (LMA).

2.2.3.-ANTIGENO TEMPRANO

Es un antígeno soluble lo que impide demostrar su presencia en el virión. (Silvestre, 1971). Su producción se lleva a cabo en la etapa temprana del ciclo replicativo viral, no es dependiente de la síntesis de DNA viral, (Pearson, 1980). Esta formado por un complejo de polipeptidos con peso molecular de 4.7×10^4 a 6×10^4 y 8.5×10^4 daltons. Es inactivado a 56 grados centígrados durante 30 min, (Demissie, 1973).

Este complejo fue dividido en dos componentes, basándose en los patrones de tinción fluorocrómica que se relacionan con la especificidad serológica y en la sensibilidad a la fijación con metanol, el componente "D" o Difuso y el componente "R" o Restringido. (Hente, 1971).

Estos dos componentes son diferenciados por la resistencia a ciertos fijadores: el componente "R" es destruido en un 95 % por el etanol o metanol pero es preservado por acetona. El "D" no es sensible al alcohol, (Henle, 1971).

Los antisueros marcados con fluorocromo que reaccionan únicamente con los complejos con peso molecular entre 4.7×10^4 a 6.0×10^4 daltons en células RA-II fijadas con metanol y acetona, indican que son componentes del antígeno "D". Los antisueros dirigidos contra polipeptidos de 8.5×10^4 daltons solo fluorescen con células fijadas con acetona, lo cual indica que son componentes del antígeno "R", (Pearson, 1983).

El componente "D" es característico en pacientes con una infección primaria aguda.

El componente "R" se encuentra en pacientes con una reinfección, que no necesariamente es causada por VEB.

2.2.4.-ANTIGENO CAPSULAR

Fue el primer antígeno detectado por inmunofluorescencia indirecta, (Henle y Henle, 1966) originalmente llamado "El antígeno VEB", se puede localizar en el núcleo o en el citoplasma de células que contengan partículas virales. Posteriormente la presencia de este antígeno fue corroborada por medio de microscopía electrónica, (Henle y Henle, 1966; Hinuma, 1967).

Un número de polipeptidos inducidos por VEB intracelularmente, son identificados y clasificados como componentes del antígeno capsular viral. Estos polipeptidos tienen un peso molecular dentro del rango de 2.6×10^4 a 2.0×10^5 daltons, (Pearson, 1980; Thorley-Lawson, 1982 a), y forman parte estructural de la capsida viral, cuya expresión está basada en la síntesis de DNA viral, (Silvestre, 1974).

2.3.-EXPRESION DE ANTIGENOS EN LINEAS CELULARES PORTADORAS DEL VIRUS EPSTEIN-BARR.

Todas las líneas celulares portadoras del DNA del VEB expresan uno o varios de los antígenos descritos anteriormente. El antígeno nuclear es el único antígeno presente en líneas celulares continuas y portadoras del VEB. Los otros tres antígenos detectados serológicamente MA, EA, VCA son expresados en líneas celulares con ciclo lítico completo, sin embargo MA está asociado con varias células productoras y no productoras, (Yata y Klein, 1969).

La frecuencia de células productoras activas para EA y VCA es usualmente baja, rara vez excede del 10 %. Las líneas celulares pueden mantener una relativa frecuencia constante de células positivas para VCA y EA, aunque pueden cambiar a un estado no productivo en un tiempo, o bien activar dichas células con 5-Iododeoxitridina, para obtener una máxima exposición de antígeno temprano, o con Phorbol 12-myristato 13-acetato (TPA) para una máxima exposición del antígeno capsular, (Hammar, 1979)

En las líneas celulares no productoras, (Rael, Namalwa, A.V. Ramos) tenemos un 100 % de expresión para EBNA pero, un 0 % para los demás antígenos. La inducibilidad es negativa en estas líneas lo cual las descarta completamente para uso del trabajo que se está realizando.

Por el contrario las líneas productoras del virus y productoras abortivas (RAJI, P3HR-1) del virus, presentan cierto porcentaje de producción de los diferentes antígenos, además de que se puede inducir la producción de dichos antígenos utilizando las pirimidinas halogenadas antes mencionadas, (Hamper, 1979).

2.4.-RESPUESTA INMUNOLÓGICA.

Durante una infección aguda en la que se está replicando el antígeno viral, se manifiestan los antígenos Capsular y Temprano (al igual que los otros antígenos) por lo tanto, se inicia la producción de anticuerpos específicos o se elevan en forma importante. Dicha producción de anticuerpos contra los diferentes antígenos de VEB, se producen en épocas diferentes de la infección.

Durante una infección aguda activa se produce antígeno capsular viral, el cual dura tres semanas, posteriormente este antígeno se deja de producir y se ensambla al DNA de la célula hospedera produciendo anticuerpos específicos, los cuales pueden

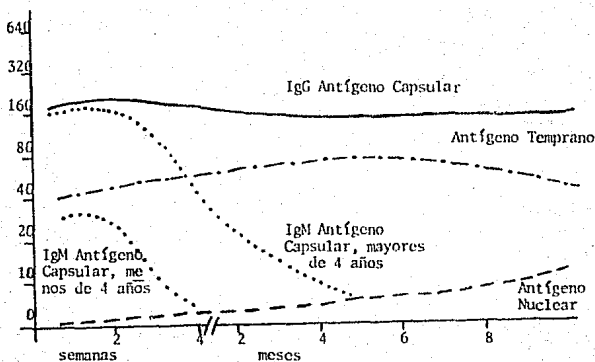
T
I
T
U
L
O

D
E

A
C
S.

F
L
O
R
E
S
C
E
N
T
E
S

FIGURA 1



TIEMPO DESPUES DE INICIAR EL CUADRO CLINICO.

Ac : anticuerpos.

Representación esquemática de la evolución de inmunoglobulinas contra los diferentes antígenos del VEB en niños con Mononucleosis Infecciosa. (Sumaya-Ench, 1985).

ser detectables como antígeno nuclear (EBNA). EL nivel de anticuerpos contra EBNA se mantiene en esta forma durante largo tiempo, al desencadenarse una reactivación los niveles de EBNA se elevan. Subsecuentemente el antígeno temprano se manifiesta como respuesta celular ante la presencia del genoma.

Como se observa en la figura 1, el antígeno capsular produce anticuerpos IgM con títulos significativos de dos a cuatro semanas después del inicio de la infección y pueden mantenerse durante varias semanas más con títulos entre 1:5 a 1:160 como máximo. La producción de IgG ya se encuentra incrementada durante la tercera o cuarta semana de la infección, llegando a un nivel máximo con un título de 1:160. Después de la sexta semana post-infección los títulos bajos de IgG pueden perdurar toda la vida, (Sumaya, 1984).

El antígeno temprano produce anticuerpos IgG con sus componentes específicos: "D" (difuso) que generalmente indica una infección aguda reciente y "R" (restringido) que indica una reinfección de VEB ya no necesariamente tiene que ser VEB el patógeno principal de esa reinfección.

Durante una infección primaria aguda se presenta la siguiente respuesta:

- 1.-Detección temprana de IgM con título detectable 1:5 hasta 1:160 que se considera alto y un decremento subsecuente.
- 2.-Títulos elevados de IgG contra VCA durante el curso de la enfermedad observando un aumento en muestras pareadas, pueden ser significativos desde 1:10 o mayores de 1:160.

2.5.-INTERPRETACION DE ANTICUERPOS SERICOS INDUCIDOS POR YEB

| EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD | AG. CAPSULAR | | AG. TEMPRANO | | AG. NUCLEAR |
|---|--------------|-----|--------------|----|-------------|
| | IgG | IgM | D | R | (EDNA) |
| SUSCEPTIBLE | - | - | - | - | - |
| INFECCION AGUDA PRIMARIA (MI) | + | + | + | -A | -B |
| INFECCION AGUDA PRIMARIA NO SINTOMATICA | + | + | - | + | -B |
| INFECCION ANTIGUA ASINTOMATICA | - | + | - | -C | +D |
| REACTIVACION DE LA ENFERMEDAD | +/- | + | + | + | +E |

A : En adultos < 10 %. En niños con MI aguda es 20 % mayor la respuesta al componente R.

B : Titulos < 1:5 en infecciones agudas.

C : Respuesta muy débil al componente R.

D : Titulos estables moderados.

E : Niveles estables, son menores los titulos en pacientes inmunocomprometidos.

(Sumaya, 1987)

Una infección crónica es diagnosticada por ausencia de IgM para antígeno capsular y presencia de anticuerpos con títulos constantes contra antígeno temprano en su tipo restringido. (Sumaya, 1986).

Estudios seroepidemiológicos, (Epstein, 1979 - 3) demuestran que en una MI aguda el antígeno temprano con el componente "D" es más frecuente que el "R". En contraste en sueros de pacientes con LB se presenta con mayor frecuencia el "R" o bien "R" + "D" pero no sólo el "D". En pacientes con CNF presentan ambos predominando el "D".

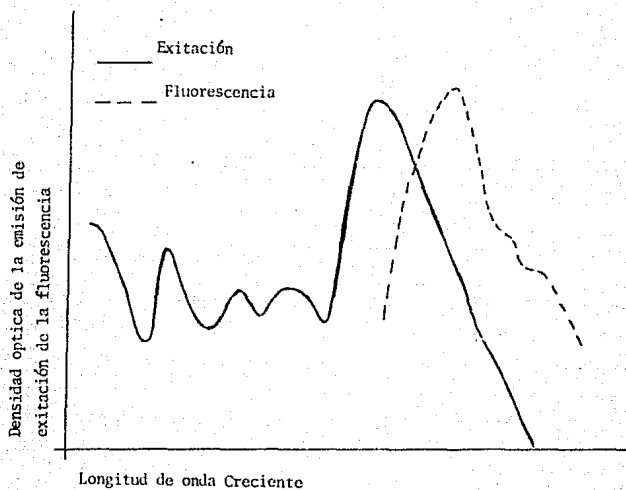
3.-FLUORESCENCIA

La fluorescencia es la luminosidad de una sustancia, causada por exposición a Luz Ultravioleta, fue en 1801 cuando Ritter descubre el espectro de luz ultravioleta en la luz solar, y en 1852 Stokes la utiliza en sus observaciones sobre la reacción del espectro del fluor, ante esta radiación.

En 1904, Kohler publica el trabajo sobre, el Microscopio de Luz Ultravioleta y en 1908, Kohler y Siedentap desarrollan la Microscopía de Fluorescencia.

En 1914, Hager y Provezec, empiezan a utilizar ciertos tintes orgánicos (FLUOROCROMOS), para inducir fluorescencia secundaria y en 1950, A.H. Coons y M.H. KAPLAN realiza los

FIGURA 2



Espectro de absorción y emisión de un componente fluorescente.

(Sites P.D., Stobo D.J., Funderberg H.H., Wells J.V., 1985)

primeros trabajos sobre la localización de antígenos marcados con fluorocromos, iniciándose de esta manera la INMUNOFLUORESCENCIA.

3.1.-INMUNOFLUORESCENCIA, (IF).

La Inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica o citoquímica para la identificación y localización de antígenos mediante inmunoreacciones, (Coons, 1941).

Según Lawson, 1972 consiste básicamente en la capacidad que tienen algunas sustancias (FLUOROCROMOS), de absorber una longitud de onda determinada y reemitirla en una longitud de onda mayor, (figura, 2), esto permite que pueda ser visible al ojo humano, por ejemplo el isotiocianato de Fluoresceína (FITC) tiene una absorción máxima a 450 - 500 nm y emite su color verde aproximadamente a 500 y 550 nm.

Utilizando esta propiedad se conjugan antisueros con fluorocromos, para posteriormente agregar este conjugado a las células o tejidos infectados, formándose el complejo antígeno anticuerpo estable, (figura, 3).

Finalmente se observa al microscopio cuya fuente luminosa es de alta intensidad con filtros de excitación para producir fluorescencia por activación y filtros barrera para eliminar las ondas luminosas que interfieran.

FIGURA 3
REACCIONES DE INMUNOFLUORESCENCIA



Ag



Ac



COMPLEJO Ag-Ac



ANTI-Ac



FLUOROCROMO



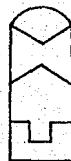
ANTI-Ac-MARCADO



COMPLEJO



ANTI-Ac-MARCADO

COMPLEJO
Ag-Ac-ANTI-Ac-
MARCADO

Los anticuerpos inespecíficos no pueden reaccionar con antígenos específicos.

4-FORMAS DE DIAGNOSTICO.

Un carácter esencial de los comienzos de la microbiología científica fue la demostración de los agentes etiológicos de manera que resulten evidentes los microorganismos causales de la enfermedad. El establecimiento de nuevos métodos de diagnóstico que permitieron detectar en forma indirecta y cuantificar la presencia de gérmenes en el hospedero desarrolla la serología con diferentes variantes lo que permite hoy en día una mayor precisión y rapidez.

La diversidad de enfermedades producidas por YEB ha despertado el interés de varios grupos de científicos quienes desde 1960 hasta la fecha se han preocupado por aumentar los conocimientos al respecto de este virus además de la implementación de nuevas pruebas diagnósticas más sensibles y específicas, las cuales resultan de gran ayuda para establecer un manejo adecuado y rápido en los pacientes infectados.

Las pruebas más usadas en la investigación de YEB son las siguientes:

| | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) | Costo (\$) | Tiempo (hrs) |
|--------------------------------|------------------|-------------------|------------|--------------|
| Radioinmunoensayo | 99 | 99 | alto | 6 |
| ELISA | 94 | 90 | alto | 6 |
| Hibridación | 99 | 99 | alto | 96 |
| Inmunofluorescencia indirecta. | 99 | 98 | bajo | 3 |
| Aislamiento Viral | 99 | 99 | alto | 3 s |
| Paul-Burnet-Davidson | 45 | 20 | bajo | 24 |

s = semanas.

5.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El VEB es un agente patógeno muy diseminado entre la población infantil por lo que su estudio es de gran importancia ya que, como se mencionó anteriormente sus manifestaciones clínicas son muy inespecíficas, originándose los problemas de diagnóstico ante una sugerente Mononucleosis Infecciosa con anticuerpos heterófilos negativos, siendo esta prueba en la actualidad la más utilizada para el diagnóstico de dicha patología. Ante estas características puede asociarse a otro agente etiológico como Citomegalovirus, Toxoplasma, Hepatitis Infecciosa, y en algunas ocasiones se confunde con Parotiditis o Rubéola.

Consideramos que ante tanta incertidumbre es necesaria una prueba específica, sensible, rápida y además que no sea muy costosa.

Siendo Inmunofluorescencia Indirecta la prueba que reúne estas características, se estandarizó en el Hospital Infantil de México para la determinación de los antígenos temprano y capsular del VEB.

Considerando que Inmunofluorescencia Indirecta posee alta sensibilidad y especificidad se podrán determinar los antígenos temprano y capsular del VEB para un diagnóstico rápido y certero ante una probable Mononucleosis Infecciosa.

6.-OBJETIVOS:

- 1.-Estandarizaci6n del m6todo de INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA para la identificaci6n de anticuerpos contra el Virus Epstein-Barr.**
- 2.-Identificaci6n de los marcadores antigenicos del Virus Epstein-Barr en pacientes con Mononucleosis infecciosa y en otros cuadros patol6gicos asociados a este virus.**

7.-METODOLOGIA:

7.1.-OBTENCION DE SUEROS

Las muestras serológicas utilizadas en el presente trabajo se obtuvieron de pacientes que ingresan al Hospital Infantil de México, "Federico Gómez". Dichas muestras fueron canalizadas al Laboratorio de Virología en donde fueron procesadas. La muestra de sangre sin heparina se mantuvo a temperatura ambiente durante 60 min para que se retrajera el coágulo. Posteriormente se separó con un aplicador el coágulo de las paredes del tubo y se centrifugó a 1100 g durante 5 min para separar el suero, el cual fue depositado en un tubo de polipropileno congelándose a -20 grados centígrados hasta el momento que se hizo la prueba diagnóstica.

7.2.-DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgM CONTRA ANTIGENO CAPSULAR

Para poder realizar el presente trabajo fue necesaria la estandarización de la metodología de Inmunofluorescencia Indirecta.

Se inició con la adaptación de los cultivos celulares a las condiciones del laboratorio. Estas líneas celulares linfoblastoides RAJI y P3HR-1, se mantuvieron en el mismo tipo de medio (RPMI-1640, Halzeron), suplementado con suero fetal de ternera (Hycton), mezcla de antibiótico en los porcentajes originales para una propagación y almacenamiento celular.

Posteriormente se cambio en forma progresiva el suero fetal de ternera Hyclon a Biocel hasta cambiarlo completamente. El objetivo de este cambio es poder utilizar los recursos de facil acceso con los que cuenta la institucion ya que los productos originales con los que se mantienen los cultivos celulares son de importacion y por lo tanto de dificil acceso.

Despues de esta adaptacion se activaron ambas lineas celulares de la siguiente manera.

7.2.1-PREPARACION DE LAMINILLAS PARA IF

Se utilizaron celulas P3HR-1, las cuales fueron donadas por la Universidad de Texas Health Science Center. Pertenecen a una linea celular de linfocitos B productora de YEB. Se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 20 % de suero fetal bovino, 1 % de mezcla de antibi6ticos (P. 100 U/ml, E. 5 ug/ml), se incubaron a 37 grados centigrados en atmosfera de CO₂ al 5 % durante 7 dias. Despues de este tiempo de incubacion las celulas se ajustaron a una concentracion de 5×10^5 cel/ml de medio RPMI-1640 suplementado. Posteriormente las celulas fueron tratadas con 20 ng/ml de Phorbol 12-miristato 13-acetato (TPA) incubandolas a 32 grados centigrados por 6 dias. Pasado este tiempo las celulas fueron centrifugadas a 1100 g durante 10 min, se descart6 el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en solucion balanceada de fosfatos (PBS) ph 7.2 al mismo volumen que se tenia inicialmente, nuevamente se procedi6 a centrifugar repitiendo el lavado por dos ocasiones, finalmente

el paquete fue resuspendido en PBS a una dilución 1:10 con una concentración celular final de 1×10^6 cel/ml de PBS, de esta suspensión celular se agregaron 20 μ l a cada círculo del portaobjetos para fluorescencia. Se secaron a temperatura ambiente por 30 min y se fijaron con acetona durante 10 min. Se almacenaron a -20 grados centígrados.

7.2.2-DILUCION Y ADSORCION DEL SUERO PROBLEMA

Para determinar IgM se trató al suero problema con una suspensión celular de Staphylococcus aureus Cowan I de la siguiente manera:

- 1.-Se preparó la suspensión de Staphylococcus aureus Cowan I al 50 % en PBS y se agregaron 40 μ l de esta suspensión en tubos eppendorf, por cada 5 μ l de suero problema.
- 2.-Se mezcló e incubó a 37 grados centígrados en baño maría durante 10 min.
- 3.-Se centrifugaron a 7270 g. durante 3 min.
- 4.-Se colocaron 20 μ l del sobrenadante en cada uno de los círculos del portaobjetos con las células previamente fijadas.
- 5.-Se incubaron a 37 grados centígrados durante 60 min en cámara húmeda.
- 6.-Se lavaron con PBS, de 5 min cada lavado.
- 7.-Se agregaron 20 μ l de la mezcla del conjugado antihumano IgM con azul de Evans a cada círculo del portaobjetos.

- 8.-Se incubaron a 37 grados centigrados durante 30 min en cámara húmeda y en oscuridad.
- 9.-Se repitió el paso 6.
- 10.-Se montaron en glicerina tamponada.
- 11.-Se observaron al microscopio con sistema óptico de fluorescencia.

7.3.-DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgG CONTRA ANTIGENO TEMPRANO.

7.3.1.-PREPARACION DE LAMINILLAS PARA IF.

La determinación de anticuerpos para antígeno temprano requiere como sustrato células RAJI. El proceso para cultivar a dichas células fue similar al que se siguió con las células PEHR-1.

5

- 1.-Con una concentración de 4×10^5 cel/ml y en un volumen de 75 ml de medio se agregó 0.3 ml de 5-Iododeoxiuridina (IUDR) más 0.3 ml de Hipoxantina-Aminopterina. Se cubrió el frasco con papel aluminio completamente para evitar que la luz inactivara la 5-Iododeoxiuridina. Se incubó a 37 grados centigrados durante 24 horas.
- 2.-Después de este tiempo de incubación se lavaron las células con solución balanceada de Hanks y se resuspendió el paquete celular en 75 ml de medio suplementado.

- 3.-Se agregaron 0.3 ml de Hipoxantina-Timidina y se dejaron incubar a 37 grados centigrados con atmosfera de CO₂ durante 24 horas.
- 4.-Nuevamente se sacaron las celulas de la estufa para centrifugarse a 1160 g durante 20 min, descartando el sobrenadante y repitiendo el lavado 2 ocasiones. Posteriormente el paquete celular fue resuspendido en 0.4 ml de PBS.
- 5.-De la suspensión final se agregaron 20 ul a cada pozo de las laminillas para fluorescencia y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- 6.-Se fijaron con metanol-acetona al 50 % durante 10 min. Se almacenaron a - 20 grados centigrados hasta ser utilizadas.

7.3.2.-MANEJO DE SUEROS

- 1.-En una placa de microtitulación se hicieron las diluciones de los sueros problema con PBS, 1:10 y 1:40.
- 2.-Se agregaron 20 ul de cada una de las diluciones de los sueros problema a los pozos de las laminillas.
- 3.-Estas fueron incubadas durante 45 min a 37 grados centigrados en cámara húmeda.
- 4.-Se lavaron con PBS dos veces, de 5 min cada lavado.
- 5.-Se agregó el conjugado IgG antihumano con azul de Evans incubándose durante 45 min a 37 grados centigrados en cámara húmeda y en oscuridad.
- 6.-Se repitió el paso 4.

7.-Se montaron con glicerina tamponada.

8.-Las laminillas fueron observadas en un microscopio con sistema óptico de Fluorescencia.

En estas pruebas se utilizaron como control negativo laminillas con células MOLT-4 , que son linfocitos B, los cuales carecen del plásmido de VEB.

B.-RESULTADOS

Durante la estandarización se observó que en los primeros cambios de suero las células no alteraron su morfología, sin embargo después de 9 pases la morfología ya no era la misma. En cuanto a la reacción antígeno-anticuerpo, no se presentó ninguna alteración, esto se confirmó con los controles que se ponían en cada prueba.

La reacción antígeno-anticuerpo que se llevó a cabo en este método, dio como resultado la emisión de fluorescencia, de color amarillo verdoso en el caso de reacción positiva al ser expuesto este complejo a la luz ultravioleta en un microscopio de epifluorescencia y en el caso de reacción negativa al incidir la luz ultravioleta sobre el colorante de contraste que se utilizó (azul de Evans), se reduce y da un color rojo. Esta respuesta se observó para antígeno capsular en la figura 4, para antígeno temprano "D" en la figura 5 y para antígeno temprano tipo "R" en la figura 6.

En la figura 1 se muestra la respuesta positiva para antígeno capsular, la fluorescencia emitida es de color amarillo verdoso en el contorno celular desvaneciéndose hacia el centro de la célula el cual se ve rojo, todo esto resaltando en un fondo negro. En la figura 2 se observan células con reacción positiva antígeno temprano tipo D, en estas la fluorescencia es total y en forma difusa ya que no se delimitan los contornos celulares como en el caso de antígeno temprano y capsular. En la figura 3 se observan células positivas para antígeno temprano

tipo R, esta fluorescencia se limitaba en diferentes zonas de la célula tornándose difusa hasta verse oscuras las otras partes de dicha célula.

Los porcentajes de positividad obtenidos por este método en 209 muestras fueron, del 82 % para antígeno temprano y el 51 % para antígeno capsular, como también podemos notar existió un número mayor de niños menores de 5 años, lo que nos sitúa en lo ya reportado en la literatura mundial con respecto a la mayor incidencia de infecciones en edad temprana, (cuadro 1).

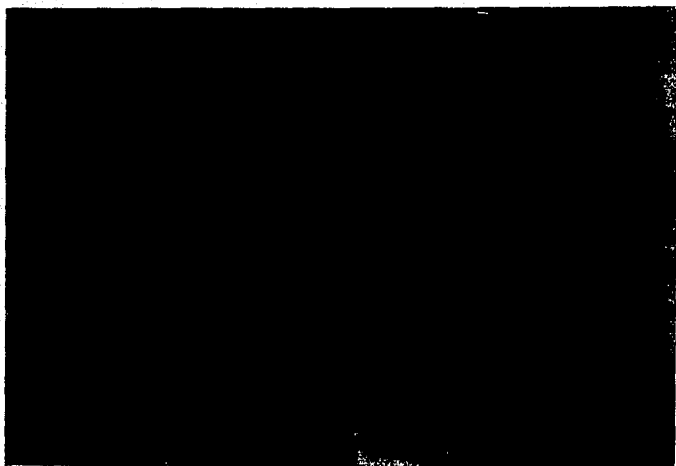
En el cuadro 2, del 82 % de las muestras positivas para antígeno temprano el 59 % fueron positivas para componente D y el 41 % para el componente R, referimos los datos de 172 muestras séricas a las cuales se les determinó antígeno temprano, podemos apreciar que en marcadores positivos contra tipo D, se detectaron 102 casos positivos con un título mayor de 1:10 lo cual refleja la frecuencia de infecciones primarias que se establecen con este marcador, con este número de pacientes positivos se pudo establecer una proporción del 59 % del tipo D, mientras que para el tipo R la proporción fue ligeramente inferior ya que únicamente 70 pacientes presentaron un título mayor de 1:10, lo que nos dio una proporción del 41 %.

En este cuadro también se refleja la proporción de pacientes en los cuales se detectó antígeno capsular con el isotipo IgM que fue del 100 % en los 107 pacientes dentro de los que se incluyeron los 102 casos a los que se les detectó

antígeno temprano componente D lo que confirmó la primoinfección.

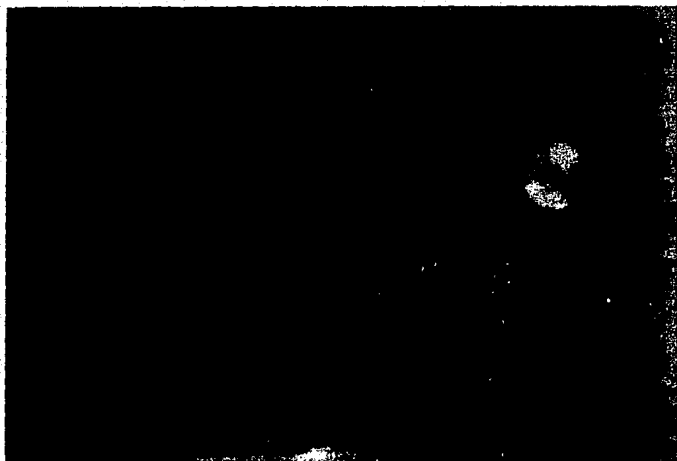
La relación VEB con neuroinfección es frecuente, en la población estudiada encontramos que de 19 pacientes con cuadro neuroinfeccioso, el 47 % de los casos presentó asociación con complejos antigenicos relacionados con la siguiente proporción: tipo D el 21 %, tipo R el 26 %, para VCA isotipo IgM el 16 % y el 53 % no se encontró relación de VEB, (cuadro 3).

FIGURA 4



Antígeno Capsular con anti-anticuerpos IgM marcados con isotiocianato de Fluoresceína, vistos en un microscopio de epifluorescencia, 2560 X.

FIGURA 5



Antígeno Temprano tipo Difuso con anti-anticuerpo IgG
marcado con Isotiocianato de Fluoresceína, vistos en un
microscopio de epifluorescencia, 2560 X.

FIGURA 6



Antígeno Temprano tipo Restringido con un anti-anticuerpo IgG marcado con isotiocianato de fluoresceína, vistos en un microscopio de epifluorescencia, 2560 X.

CUADRO 1

**IDENTIFICACION DE MARCADORES ANTIGENICOS DEL VEB EN
PACIENTES EN EDAD PEDIATRICA**

| No. DE MUESTRAS | TIPO DE MUESTRA SUERO | EDAD (años) | |
|--------------------|--------------------------|-------------|------|
| | | 5 | 6-15 |
| 209 | 209 | 136 | 73 |
| % | 100 | 65 | 35 |

| ANTIGENOS IDENTIFICADOS | No. DE MUESTRAS | % |
|----------------------------|-----------------|----|
| EA | 172 | 82 |
| YCA | 107 | 51 |

EA: ANTIGENO TEMPRANO, YCA: ANTIGENO CAPSULAR VIRAL.

CUADRO 2

IDENTIFICACION DE MARCADORES ANTIGENICOS DEL
VEB EN PACIENTES DE EDAD PEDIATRICA

| ANTIGENO IDENTIFICADO | No. DE MUESTRAS | MARCADORES POSITIVOS | | |
|-----------------------|-----------------|----------------------|------------|--------------|
| | | D () 1:10 | R () 1:10 | IgM () 1:5 |
| ANTIGENO TEMPRANO | 172 | 102 59 % | 70 41 % | |
| ANTIGENO CAPSULAR | 107 | | | 107 100 % |

D: TIPO DIFUSO

R: TIPO RESTRINGIDO

CUADRO 3

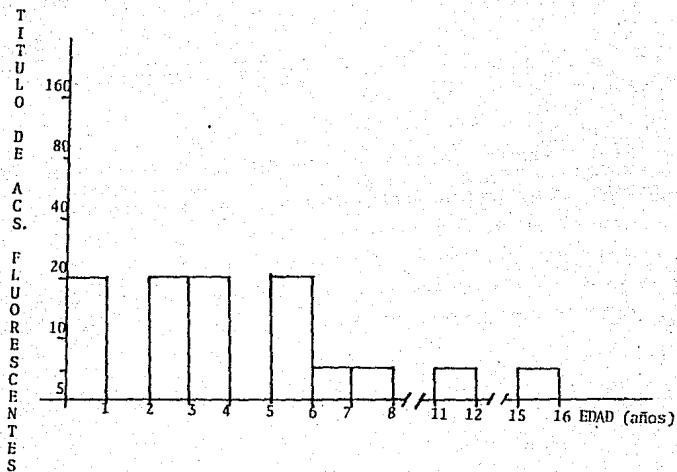
IDENTIFICACION DE MARCADORES DE VEB EN LCR
DE NIÑOS CON NEUROINFECCION

| NUMERO DE PACIENTES | EA | | VCA | PACIENTES NEGATIVOS |
|------------------------|------|------|------|------------------------|
| | D | R | IgM | |
| 19 | 21 % | 26 % | 16 % | 53 % |

EA : Antígeno Temprano, D : Difuso, R : Restringido.

VCA : Antígeno Capsular Viral.

FIGURA 7



Titulos de anticuerpos IgM contra Antigeno capsular con respecto a la edad de los pacientes detectados por el metodo de Inmunofluorescencia Indirecta.

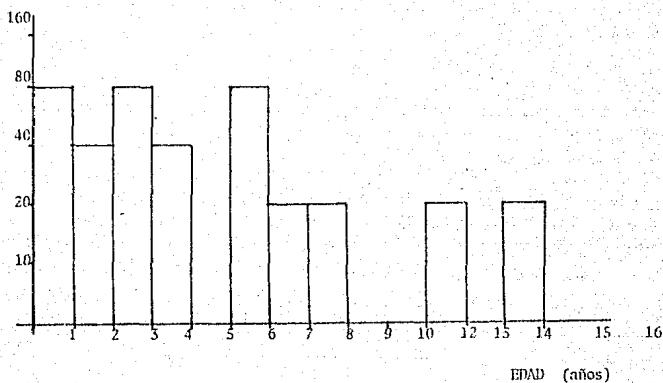
T
I
T
U
L
O

D
E

A
C
S.

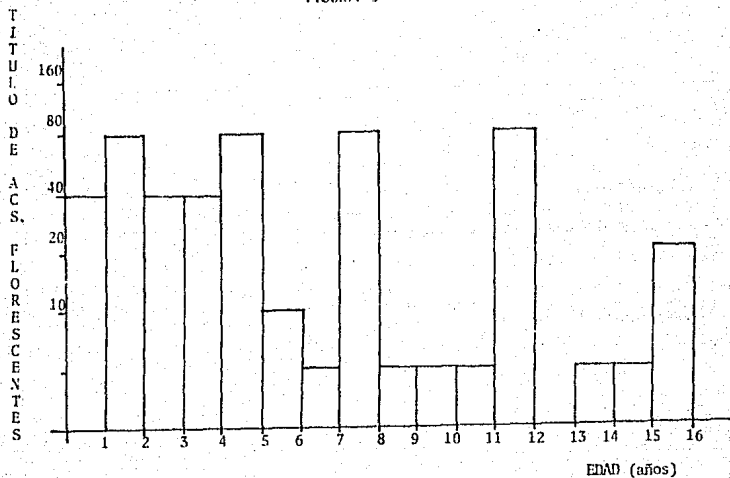
F
L
O
R
E
S
C
E
N
T
E
S

FIGURA B



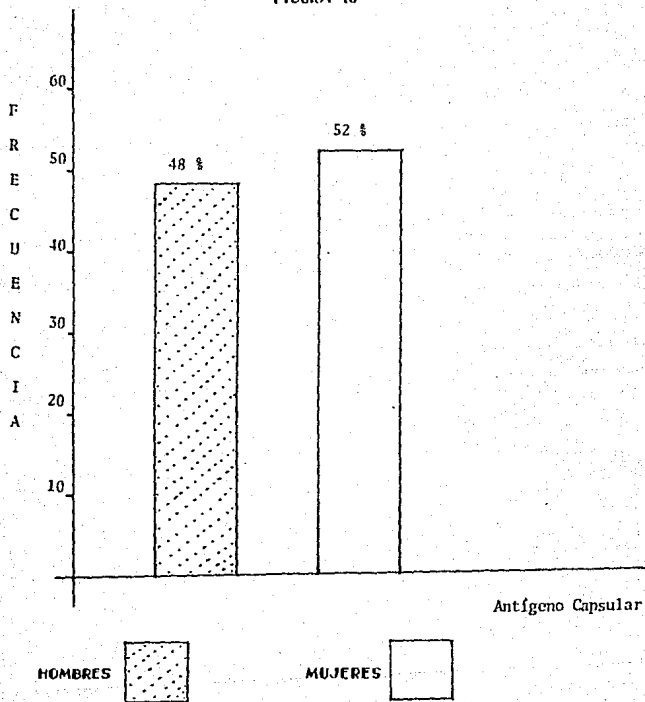
Título de anticuerpos contra Antígeno Temprano componente tipo "D", con respecto a la edad de los pacientes detectados por el método de Inmunofluorescencia Indirecta.

FIGURA 9



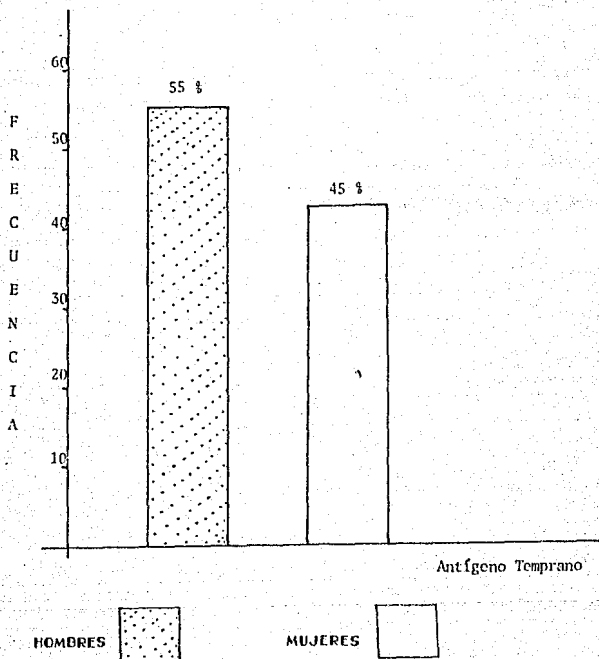
Título de anticuerpos contra Antígeno Temprano componente tipo "R", con respecto a la edad de los pacientes detectados por el método de Inmunofluorescencia Indirecta.

FIGURA 10



Establecimiento de la frecuencia de los títulos de anticuerpos contra Antígeno Capsular en hombres y mujeres de un total de 107 muestras.

FIGURA 11



Establecimiento de la frecuencia de los títulos de anticuerpos contra Antígeno Temprano en hombres y mujeres de un total de 172 muestras.

9.-ANALISIS Y DISCUSION

Debido a que la sintomatología por la infección con el virus Epstein-Barr es muy inespecífica generalmente las pruebas serológicas se solicitan semanas después de haber iniciado el cuadro clínico, etapa en la cual los títulos de anticuerpos para los diferentes antígenos son muy variados dependiendo de la etapa de evolución de dicha enfermedad, probablemente por esta razón los títulos que detectamos son igual o mayores de 1:5 para antígeno capsular e igual o mayores de 1:10 para antígeno temprano.

Aunque la determinación de anticuerpos del isotipo IgM es prueba suficiente para diagnosticar una infección aguda, ya que es la primer inmunoglobulina que aparece inmediatamente después de la infección, es necesaria la determinación de anticuerpos IgG contra antígeno temprano de VEB, para poder determinar el tipo de infección dependiendo del componente que se determine, "D" o "R", ya que el "R" pudiera estar asociado a otro agente etiológico.

Como se indicó anteriormente las células RAJI y P3HR-1 presentan un porcentaje de exposición de los antígenos en forma natural, sin embargo para la determinación de los anticuerpos fue necesario incrementar la replicación del plásmido; para lo cual utilizamos 5-Iododeoxiuridina y Phorbol 12-miristato 13-acetato, los que aumentan la mitosis y favorecen la replicación acelerada.

La presencia de la proteína A del Staphylococcus aureus Cowan I se utilizó para adsorber el factor reumatoide el cual interfiere con los anticuerpos inducidos por antígeno capsular. El paso de adsorción elimina los falsos positivos dados por dicho factor y por lo tanto elimina la fluorescencia inespecífica, (Sumaya, 1982). Este fenómeno se comprobó trabajando sueros de pacientes clínicamente sanos sin adsorverlos previamente, los resultados fueron 100 % positivos para dicho antígeno, posteriormente los mismos sueros fueron adsorbidos obteniéndose una respuesta negativa para el antígeno antes mencionado.

Los sueros problema fueron adsorbidos obteniéndose los resultados que se observan en la tabla I, que el 51% de las muestras que fueron positivas para el isotipo IgM contra VCA, fue suficiente para confirmar el diagnóstico clínico de una infección aguda, sin embargo el 49% fue negativo para VCA, esto no descarta la posibilidad de una infección aguda, ya que no sabemos exactamente en que etapa de la infección clínica se encontraba el paciente, debido a que su ingreso al hospital nunca concuerda con el inicio de la infección.

Para la determinación de anticuerpos contra el antígeno Temprano además de la activación celular, el uso de los fijadores como la acetona y el metanol nos aseguraron la conservación de sus dos componentes que poseen especificidad serológica y diferente sensibilidad a dichos fijadores. Un lote de células RAJI fueron fijadas con acetona para preservar el

componente "R" ya que este es destruido por el metanol. Por otra parte se fijó otro lote de células RAJI con metanol para preservar el componente "D".

El uso de estos fijadores asegura la presencia de dichos componentes para la reacción antígeno-anticuerpo lo cual elimina el error de dar falsos negativos por ausencia de dicho componente.

Los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos del isotipo IgG contra antígeno temprano de un total de 172 muestras positivas, el 59% resultaron con un título \geq 1:10 con un componente "D", confirmando con esto una infección reciente, el 41% con un título \geq 1:10 con el componente "R" indicándonos una reinfección probablemente activada por VEB, por otro agente infeccioso o bien por alteraciones en la resistencia del huésped, el 18 % de las 209 muestras fueron negativas para este antígeno. Es pertinente aclarar que estos pacientes presentaron sintomatología asociada a VEB, siendo realmente otro virus el agente causal.

El 82 % de las muestras, con resultados positivos para antígeno Temprano indican el alto porcentaje de infección por VEB en la población infantil.

Una de las razones primordiales de este estudio es que se considera al VEB como agente etiológico de enfermedades neurológicas, por lo que la determinación de anticuerpos en estos casos tan graves determinan cual es el agente causal de

dicha patología, además de las muestras serológicas trabajadas se incluyeron Líquidos Cefaloraquídeos, (LCR) de pacientes con un cuadro clínico de este tipo, de estos LCR se obtuvieron los siguientes resultados: Como se observa en el cuadro número 3 de los 19 LCR el 15 % fueron positivos para antígeno capsular indicándonos estos resultados que se trataba de una infección aguda en etapa temprana, por otra parte el 47 % fueron positivos para antígeno temprano de los cuales 4 fueron positivos para componente "D", confirmando el resultado de antígeno capsular y 5 fueron positivos para componente tipo "R", indicándonos una reinfección, los títulos contra estos marcadores siempre serán muy bajos pero su significancia es muy alta debido a la especificidad del método.

El 53 % resultó negativo para antígeno temprano y capsular, probablemente se trataba de pacientes con una infección neurológica causada por otro agente etiológico, o bien se encontraban en una etapa aun muy temprana de la neuroinfección en la cual la determinación de anticuerpos no es posible detectarla porque los títulos son muy bajos.

El LCR que fue positivo para antígeno temprano tipo "D" pero negativo para IgM contra antígeno capsular nos indicó que se trataba de una infección aguda latente, en la cual los títulos para VCA ya no son detectables.

10.-CONCLUSIONES:

La importancia central de todos los trabajos referentes a los diferentes antígenos del VEB conciernen a la especificidad antigénica, tiempo en que aparece cada uno de ellos y el papel de los diferentes antígenos en relación con el ciclo viral y con las células del hospedero. Para su estudio existen las diferentes pruebas de diagnóstico, siendo inmunofluorescencia indirecta la adecuada para un diagnóstico rápido y seguro cumpliendo con este nuestro objetivo.

Con los ensayos efectuados se constató que las células RAJ1 es el sustrato adecuado para la determinación de anticuerpos contra antígeno temprano ya que el 82% de las muestras de pacientes con sintomatología clínica fueron positivas.

De igual manera se reafirma que las células P3HR-1 son adecuadas para la determinación de IgM contra antígeno capsular.

Los marcadores antigénicos contra VEB pueden ser detectados a cualquier edad por medio de inmunofluorescencia indirecta, con lo cual se puede diagnosticar una infección activa, aguda o crónica con una primera muestra.

En este estudio se observó que la incidencia de Mononucleosis infecciosa asociada a VEB es alta como lo indica la literatura, ya que el 82 % de las 209 muestras trabajadas fueron positivas para antígeno temprano y capsular indicando finalmente una infección aguda o crónica por VEB.

No podemos asegurar que el cambio de suero fetal de ternera no afecten a las células RAJI y P3HR-1 ya que después de un determinado número de cambios la morfología celular cambia completamente. Esto da pie a posteriores investigaciones en este campo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. (1941). Immunological properties of antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 47:200-202.
- 2.- Demissie, A. (1973). Difference in heat stability of antigens associated with Epstein-Barr virus, demonstrated by immunodiffusion. *J.Natl.Cancer Inst.* 51: 751-760.
- 3.- Einhorn L., Ernberg I. (1978). Induction of EBNA precedes the first cellular S-phase after EBV-infection of human lymphocytes. *Int.J.Cancer*; 21:157-60.
- 4.- Epstein M.A., Achong B.G. (1979-1). Introduction and general biology of the virus. In the Epstein-Barr Virus (Epstein M.A., Achong B.G., eds). Berlin: Springer-Verlag.
- 5.- Ernberg I., Klein G. (1979). Epstein-Barr Virus-Induced Antigens. In the Epstein Barr Virus (Epstein M.A., Achong B.G., eds). Berlin: 40-60.
- 6.- Gerber P., Nonovama M., Lucas S., Perlin E., Goldstein L.J. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, II: 988-989.
- 7.- Gladstone G.P., Van Heyningen W.E. (1957). Staphylococcal leucodine. *Br. J. Exp. Pathol.* 38: 123-137.
- 8.- Hammar B. (1979). Activation of the viral genome in vitro. In the Epstein-Barr Virus (Epstein M.A., Achong B.G., eds). Berlin: 284-295.

9. Henle G., Henle W. (1966 b). Immunofluorescence in cells derived from Burkitts lymphoma. *J. Bacteriol.* 91:1248-1256.
10. Henle G., Henle W., Klein G. (1971). Demonstration of two distinct components in the early antigen complex of Epstein-Barr virus infected cells. *Int. J. Cancer*; 8: 272-282.
11. Hinuma Y., Koon M., Yamaguchi J. (1967). Immunofluorescence and herpes type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.*; 1: 1045-1051.
12. Jondal M., Klein G. (1973). Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 138: 11365-1378.
13. Liabeuf A., Nelson K.A., Kourilsky F.M. (1975). The detection of the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen (EBNA) by anticomplement immunofluorescence. Immunoglobulin class of antibodies and role of complement. *Int. J. Cancer*; 15: 533-546.
14. Miller G., Niederman J.C., Andreus L-L. (1973). Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* ;288:229-232.
15. Morgan D.G., Niederman J.C., Miller G., Smith H.W., Dowallby J.M. (1979). Site of Epstein-Barr virus replication in the oropharynx. *Lancet*; 1:1154-57.
16. Niederman J.C., Evans A.S., Subrahmanyam M.S. y cols. (1970). Prevalence incidence and persistence of Epstein-Barr virus antibody in young adults. *New. Engl. J. Med.*; 282: 361-365.

- 17.-Pearson G., Dewey F., Klein G., Henle W. (1970). Relation between neutralization of Epstein-Barr virus and antibodies to cell membrane antigens induced by the virus. *J. Natl. Cancer Inst.*;45:989-997.
- 18.-Pearson G.R., Henle G., Henle W.(1971). Production of antigens associated with Epstein-Barr virus in experimentally infected lymphoblastoid cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*: 43:1243--50.
- 19.-Pearson G.R., Quattiere L.F.,(1978). Papain solubilisation of the Epstein-Barr virus induced membrane antigen. *J. Virol.*; 28:344-351.
- 20.-Pearson G.R. (1980). Epstein-Barr virus:Immunology. In *Viral Oncology* (Klein G.,ed) pp.739-67. New York: Raven Press.
- 21.-Pearson G.R., Uroman B., Sculley T., Hummel M., Kreft E. (1983). Identification of polypeptide components of the Epstein-Barr virus early antigen complex using monoclonal antibodies. *J. Virol.*;47: 193-201.
- 22.-Reedman B.M., Klein G. (1973). Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines *Int.J.Cancer*;11 499-520.
- 23.-Schulte-Holthausen H., zur Hausen H. (1970). Partial purification of the Epstein-Barr virus and some properties of its DNA. *Virology*; 40.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 24.-Silvestre D., Kourilsky F.M., Klein G., Yata Y., Neauport-Sautes C., Levy J.P. (1971). Relationship between the EBV-associated membrane antigen on Burkitt lymphoma cells and the viral envelope, demonstrated by immunoferritin labelling. *Int. J. Cancer*; 8:222-233.
- 25.-Sites P.D., Stobo D.J., Fundenberg H.H., Wells J.V. (1985). *Immunologia*
- 26.-Sixbey J.W., Nedruc J.C., Paab-Traub N., Hanes R.A., Pagano J.S. (1984). Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.*; 310: 1225-30.
- 27.-Sumaya C.V., Henle W., Henle G. y cols. (1975). Seroepidemiological study of antibodies to Epstein-Barr virus in a rural community. *J. Infect. Dis.*; 131:403-408.
- 28.-Sumaya C.V. 1981. Infecciones por Virus de Epstein-Barr. *Infectologia*; 3:221-228.
- 29.-Sumaya C.V., Ench Y., Pope R.M. (1982). Improved test for Epstein-Barr virus IgM antibody utilizing a Staphylococcus aureus absorption step. *J. Infect. Dis.*; 146:518-523.
- 30.-Sumaya C.V., Ench Y. 1985. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics*;75:1011-1019.
- 31.-Sumaya C.V. 1986. Epstein-Barr virus serologic testing: diagnostic indications and interpretations. *Pediatr. Infect. Dis.*; 5:337.

- 32.-Sumaya C.V. (1987). Epstein-Barr Virus Infections in Children. Current Problems in Pediatrics.
- 33.-Thorley Lawson D.A., Edson C.M., Geilinger K. (1982 .a). Epstein-Barr virus antigens a challenge to modern biochemistry. Adv. Cancer Res.; 36: 295-348.
- 34.-Yata J., Klein G. (1969). Some factors affecting membrane immunofluorescence reactivity of Burkitt lymphoma tissue culture cell line. Int. J. Cancer; 4:767-775.
- 35.-Yata J., Klein G., Hewetson J., Gergely L. (1970). Effect of metabolic inhibitors on membrane immunofluorescence reactivity of established Burkitt lymphoma cell lines. Int. J. Cancer; 5:394-403.

12.-APENDICE

1.- Medio para cultivo celular suplementado con:

| | |
|---|--------|
| Suero Fetal de Ternera (Hyclon) ----- | 20 % |
| Mezcla de antibiótico, (Penicilina 100 U/ml-Estreptomicina 5 ug/ml) ----- | 1 % |
| Medio RPMI-1640, (Halzeton) hidratado c.b.p. ----- | 100 ml |

2.- Phorbol 12-miristato 13-acetato, (TPA), (Sigma).

| | |
|--|-------|
| Phorbol 12-miristato 13-acetato, ----- | 20 ng |
| Medio RPMI-1640 suplementado ----- | 75 ml |

3.- 5-Iododeoxiuridina (IUDR), (Sigma)

| | |
|--------------------------|--------|
| 5-Iododeoxiuridina ----- | 5.0 mg |
| NaOH 0.1 N ----- | 1.0 ml |

4.- Hypoxantina-Aminopterin, (Sigma)

| | |
|-------------------|---------|
| Hypoxantina ----- | 3.5 mg |
| Aminopterin ----- | 0.1 mg |
| NaOH 0.1 N ----- | 1.0 ml. |

5.- Hypoxantina-Timidina, (Sigma)

| | |
|-------------------|---------|
| Hypoxantina ----- | 3.5 mg |
| Timidina ----- | 5.0 mg |
| NaOH 0.1 N ----- | 1.0 ml. |

6.- Solución Balanceada de Hanks, (Sigma).

7.- Solución Balanceada de Fosfatos, (PBS).

| | | | |
|----------------------------------|-------|------|----|
| NaCl | ----- | 8.0 | g |
| KCl | ----- | 0.2 | g |
| Na ₂ HPO ₄ | ----- | 1.15 | g |
| KH ₂ PO ₄ | ----- | 0.2 | g |
| Agua destilada | ----- | 1.0 | L. |

8.- Cultivo de Staphylococcus aureus Cowan I, según Gladstone-Van Heyniger.

9.- Azul de Evans (Sigma) al 0.2 % con PBS.

10.- Mezcla de conjugado fluoresceinado (TAGO)

| | | | |
|----------------------------------|-------|--------|-------|
| Goat F(ab) 2 Anti-Human IgM-FITC | ----- | titulo | 1:160 |
| Azul de Evans | ----- | titulo | 1:80. |

11.- Mezcla de conjugado fluoresceinado (TAGO)

| | | | |
|----------------------------------|-------|--------|-------|
| Goat F(ab) 2 Anti-Human IgG-FITC | ----- | titulo | 1:80 |
| Azul de Evans | ----- | titulo | 1:40. |

12.- Glicerina Tamponada

| | | | |
|----------|-------|-----|----|
| Glicerol | ----- | 9.0 | ml |
| PBS | ----- | 1.0 | ml |

ajustar pH 7.0