



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC**

**ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORADA A LA UNAM**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE pp65 A PARTIR
DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS
HUMANO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

Yadira Díaz Galindo

**DIR. DE TESIS: M en C. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER
Dra en C. MARTHA EUGENIA RUIZ TACHIQUÍN**

México, D. F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M en C. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER

VOCAL: Q.F.B. GERARDO GARCÍA CAMACHO

SECRETARIO: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBÁÑEZ

1ER SUPLENTE: M en C. EDUARDO DEL REY PINEDA

**2DO SUPLENTE: M en C. JOSE D´ARTAGÑAN VILLALBA
MAGDALENO**

TRABAJO REALIZADO EN LA

**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias y
Unidad de Investigación Médica en Inmunología**

**Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social**

ASESOR INTERNO

M en C. Juan Antonio Giménez Scherer

ASESOR EXTERNO

Dra en C. Martha Eugenia Ruiz Tachiquín

SUSTENTANTE

Yadira Díaz Galindo

DEDICATORIAS

A MARVIN EZAHÚ LÓPEZ DÍAZ

Quien ha sido una gran motivación para seguir adelante, le agradezco por todo el tiempo que me ha dado para poder crecer profesionalmente, para que en un futuro no muy lejano sea un gran ejemplo para él. Te amo pequeño.

A DANIEL LÓPEZ SALAZAR

Te dedico este trabajo por tu incondicional apoyo. Y agradezco tus consejos, paciencia, pero sobre todo tu amor y confianza. Te amo

A MIS PADRES

CONSUELO AURORA GALINDO Y TOMAS FÉLIX DÍAZ

A mi madre te dedico este trabajo y agradezco tu incansable labor en mi formación como mujer, madre y profesionalista, tus consejos, enseñanza, amor y cariño.
Te quiero y te admiro.

A mi padre agradezco tu apoyo incondicional y confianza.

A MIS HERMANOS

ERIDANIA DÍAZ Y RICARDO DÍAZ

Gracias por creer en mí y por ser una parte importante de mi vida.
Los quiero.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

Agradezco su apoyo para la realización de este trabajo a todos los compañeros de las Unidades de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias y en Inmunología

Principalmente y con mucho cariño, respeto y admiración.

Dra. en C. Martha Eugenia Ruiz Tachiquín

Gracias, por haberme brindado su confianza, enseñanza, por sobre todo su amistad.
Por guiarme en el laboratorio y orientarme desde New York.
Mi sincera admiración y respeto.

M en C. Juan Antonio Giménez Scherer

Gracias por tener súper poderes (sus conocimientos), lo admiro y respeto. Gracias por sus consejos y su sincera amistad y gracias por los bonitos ratos que me ha hecho pasar (las bati reuniones). Lo quiero Súper profesor.

M en C. Hilda Alicia Valdez Salazar.

Gracias amiga por tu confianza, ayuda y tu sincera amistad.

Y un gran reconocimiento por su participación en la realización de éste trabajo:

Dra. Mónica Espinoza Rojo.

Que sin conocerme me brindo su amistad y confianza.

Q.B.P. María Teresa Álvarez Muñoz, Dra. Penélope Aguilera Hernández y Flor Patricia Castillo Robles.

A MIS PROFESORES

A quienes agradezco infinitamente sus conocimientos y participación en un momento tan importante de mi vida profesional.

Q.F.B. Gerardo García Camacho, Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez, M en C. Eduardo Del rey Pineda, M en C. Jose D´artagnan Villalba Magdaleno, Q.F.B. María Antonieta Giménez Zamudio.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Con quienes compartí momentos inolvidables. Especialmente a Yessica Vázquez, Tania y Susana.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	JUSTIFICACIÓN	3
III.	HIPÓTESIS	4
IV.	OBJETIVOS	5
V.	MARCO TEÓRICO	6
	1. Citomegalovirus humano	6
	1.1. Estructura del virión	6
	2. Organización del genoma del CMVH	7
	2.1. Proteínas del virión	7
	2.1.1. Proteínas de la cápside	8
	2.1.2. Glicoproteínas de la envoltura	8
	2.1.3. Proteínas del tegumento	9
	3. Multiplicación	10
	4. Infecciones humanas	12
	4.1. Inmunopatologías asociadas a una infección	12
	5. Manifestaciones clínicas	13
	6. Respuesta inmune contra CMVH	14
	7. Modos de transmisión	14
	8. Epidemiología	16
	9. Detección en el laboratorio	17
	9.1. Métodos directos	17
	a) Detección del virus	17
	b) Detección directa de antígenos por inmunomarcaje	17
	c) Detección del virus o de su estructura RT-PCR	17
	d) Prueba de antigenemia	18
	9.2. Métodos indirectos	18
	a) Búsqueda de anticuerpos	18
	b) Métodos basados en cultivo	19
	9.3. Métodos moleculares cuantitativos	20
	10. Reacción en cadena de la polimerasa	21
	11. Estandarización del método de la PCR	21
	12. Secuenciación de un fragmento del genoma viral	25
	12.1. Preparación del ADN molde	27
	13. Clonación de productos de la PCR	29
	13.1. Enzimas de restricción	29
	13.2. Vectores de clonación	30
	13.3. Plásmidos	30
	13.4. Características que hacen adecuado a un vector de clonación	31
	13.5. Hospederos procariotas	31
	13.6. Transfección y clonación de ADN	31
VI.	OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	33

VII.	METODOLOGÍA		34
	1. Materiales		34
	2. Métodos		36
		2.1. Metodología para la extracción de ADN	36
		2.2. Metodología para la purificación del producto de la PCR a partir de un gel de agarosa	37
		2.3. Metodología para la clonación de ADN-CMVH 535 pb	39
		2.4. Metodología para la secuenciación del producto clonado de CMVH-535 pb	41
		2.5. Alineamiento de las reacciones de secuenciación	42
		2.6. Estandarización del método de la PCR	43
		A) Preparación de la curva estándar 300,000 a 3 copias de ADN de CMVH/ml de plasma	43
		B) Programa para la estandarización	45
		C) Condiciones de amplificación de la PCR	46
		2.7. Visualización de los productos de amplificación	46
VIII.	RESULTADOS		47
		1. Amplificación de ADN de CMVH-535 pb del gen <i>UL83</i> (pp65)	47
		2. Amplificación del producto de CMVH-535 pb a partir de una clona	48
		3. PCR de secuenciación	48
		3.1. Electroferogramas de las secuencias sentido y antisentido	49
		3.2. Alineamiento de los iniciadores y las secuencias a partir de la clona con la secuencia patrón	50
		4. Estandarización de la PCR	51
		5. Amplificación del gen <i>UL83</i> (pp65) a partir de muestras de plasma humano	54
		6. Amplificación del producto de CMVH-535 pb en muestras IgG e IgM-CMVH negativas y con carga viral determinada	55
		7. Amplificación testigo el gen humano β -actina (gen constitutivo)	55
		8. Amplificación de ADN del gen <i>UL83</i> (pp65) en muestras positivas al antígeno pp65	56
IX.	DISCUSIÓN		57
X.	CONCLUSIONES		60
XI.	PERSPECTIVAS		61
XII.	REFERENCIAS		63
XIII.	ANEXOS		69

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µl	Microlitros
ABI	Applied Biosystems
ACIF	Fluorescencia anti-complementaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Proteínas de ensamblaje
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BrEt	Bromuro de etidio
Cbp	Cuanto baste para
CMVH	Citomegalovirus humano
D	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Di nucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etileno tetra-acético
EIA	Inmunoenzimatica
EIC	Enfermedad de Inclusión citomegálica
FC	Factor de complemento
g	Fuerza relativa de centrifuga
gB	Glicoproteína B
GC	Guaninas Citocinas
gL	Glicoproteína L
gO	Glicoproteína O
h	Horas
HSV	Herpesvirus
IE	Proteínas tempranas antigénicas
IEA	Proteínas tempranas antigénicas inmediatas
IF	Inmunofluorescencia
IFN-γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
Kb	Kilobase
KD	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases
LA	Proteínas tardías antigénicas
LCR	Liquido céfalorraquídeo
LT	Linfocitos
m	Masa
mC-BP	Proteínas de unión de la cápside menor
MCP	Proteínas de la cápside mayor

mCP	Proteínas de la cápside menor
Mg ⁺²	Iones magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mM	Milimolar
n	Tamaño del genoma
NASBA	Ensayo basado en la secuenciación de ácido nucleico
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetros
ORF's	Marcos abiertos de lectura
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salinos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés (Polimerase Chain Reaction)
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
pp65	Blanco principal de los linfocitos T CD8 ⁺
r	Radio del rotor por cm
RCIU	Restricción crecimiento intrauterino
RN	Recién nacido
rpm	Revoluciones por minuto
SCP	Proteínas pequeñas de la cápside
seg	Segundo (s)
SNC	Sistema nervioso central
SV	Cultivo <i>Shell vial</i>
TA	Temperatura ambiente
TE	Tris-EDTA
T _M	Temperatura de alineamiento
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRL y IRL	Repetido terminal e interno que limita el segmento largo
U	Unidades
UL	Región larga
UL83	Gen que codifica para la proteína pp65
US	Región única corta
UV	Luz ultravioleta
VIH 1 ó 2+/SIDA	Virus de la Inmunodeficiencia /Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UIMEIP	Unidad Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

I. MARCO TEÓRICO

1. Citomegalovirus humano

El CMVH pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Betaherpesviridae*, género *Citomegalovirus*, especie herpesvirus humano 5. Esta subfamilia se diferencia de las otras (alfa, gamma) de acuerdo a las propiedades biológicas, el ciclo reproductivo de es lento, crecen lentamente en cultivos, la célula infectada puede aumentar mucho de tamaño (citomegalia).y puede permanecer en latencia en glándulas secretoras, células linfoides, riñón y otros tejidos. **Figura 1.** ^(1, 2)

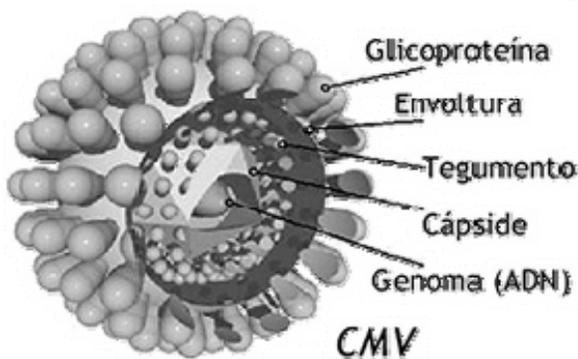


Figura 1. Modelo tridimensional del CMVH donde muestra los componentes estructurales del mismo. En el **núcleo** se localiza el genoma de ADN lineal de doble cadena; **cápside** (100-110 nm de diámetro) con 162 capsómeros; **tegumento** material amorfo que rodea a la cápside y **envoltura** lipídica con glicoproteínas en la superficie. Tomado y modificado de: http://danival.org/600%20microbio/7400notasvir/algunos/vir_algunos_cmv.html

El virión puede tener hasta 35 proteínas, incluso contiene enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de ADN y procesamiento proteico. El virión maduro del CMVH mide entre 150 y 200 nm.

1.1. La estructura del virión consta de:

ADN: ácido desoxirribonucleico lineal de doble cadena. Tamaño aproximado de 120 y 230 Kpb, esta diferencia depende de las secuencias repetitivas internas y terminales que pueda tener el virión. Fluye inmediatamente tras ser liberado de la nucleocápside al núcleo de la célula infectada.

NÚCLEO: estructura proteica que contiene el ADN viral.

CÁPSIDE: estructura formada por proteínas que se ensamblan dando forma a una estructura icosaédrica de 162 capsómeros (pentámeros y hexámeros).

TEGUMENTO: estructura amorfa de proteínas que rodea a la cápside y mantiene la asociación entre esta y la envoltura del virión, las proteínas que lo constituyen intervienen en procesos esenciales del virus, como el mantenimiento de su estructura, regulación de su expresión génica e influye en la respuesta de las células del hospedero a la infección de CMVH.

ENVOLTURA: estructura formada por glicoproteínas, algunas de ellas participan en la patogénesis desencadenada por el CMVH. ⁽²⁾

2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL CITOMEGALOVIRUS HUMANO

Solo una cepa del CMVH ha sido completamente secuenciada y adaptada al laboratorio, la cepa AD169 (*GeneBank* NC_00347) su secuencia cuenta con 230,283 pb. Esta secuencia reveló que el ADN de CMVH contiene 225 marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, *ORF's* por sus siglas en ingles) que codifican para 160 distintas proteínas aproximadamente. **Figura 2.**⁽²⁾

El genoma del CMVH es el más grande y complejo entre los herpesvirus, está constituido de ADN lineal de doble cadena con aproximadamente 230 Kb, PM de 155×10^6 D, alto contenido de GC.⁽²⁾ Organizado por dos componentes L (largo), usualmente de un tamaño de 100 Kb, la cual codifica cerca de 100 genes y S (corto), cada uno de ellos consta de secuencias únicas (U_L y U_S) no repetidas, flanqueadas por repeticiones invertidas denominadas ab y b'a' (TR_L/IR_L) para L y a'c' y ca (IR_S/TR_S) para S, orientados en ambas direcciones ($5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$).^(1, 49) Estas regiones repetidas permiten reorganizaciones de las regiones únicas del genoma.⁽⁵⁰⁾

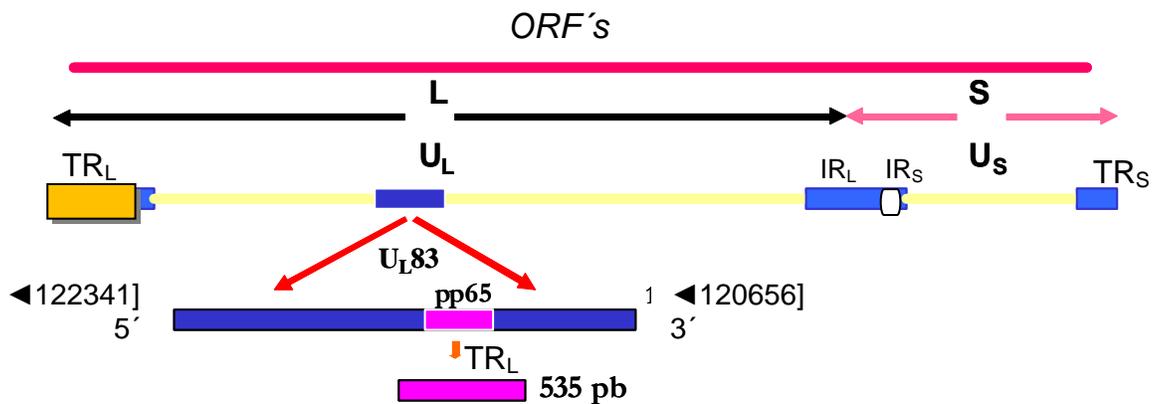


Figura 2. Organización del genoma del CMVH. Marcos de lectura abiertos (*ORF's*), U_L83 se localiza dentro del componente U_L , U_L83 gen que codifica para la proteína pp65, este fragmento se localiza en las bases número 122341 hasta 120656, por lo tanto el gen U_L83 mide 1685 bases de las cuales se amplificaron 535. Tomado y modificado de: *Journal of Virology*, Oct. 1995, p. 5959–5968, Vol. 69, No. 10. Copyright q 1995, American Society for Microbiology.

2.1. PROTEÍNAS DEL VIRIÓN

Las partículas purificadas del CMVH contienen de 30 a 40 polipéptidos con un PM entre 20 a 300 kD.⁽³⁻⁶⁾ Varnum y colaboradores en el 2004, reportaron que el virión esta compuesto por 50% de proteína de tegumento, 30% de proteína de cápside, 13% de proteína de envoltura y 7% de proteínas no definidas.⁽⁷⁾

- ⇒ La proteína grande de la cápside (MCP) codificada por el gen U_L86 .
- ⇒ La proteína pequeña de la cápside (mCP) codificada por el gen U_L85 .
- ⇒ Las proteínas pequeñas de unión de la cápside (mC-BP) codificadas por el gen U_L46 , también llamado ($U_L48/49$).

- ⇒ Las proteínas más pequeñas de la cápside (SCP) codificadas por el gen *UL48.550*, también llamado (*UL48/49*).
- ⇒ Tres distintas proteínas de ensamblaje (AP) codificadas por los genes *UL80*, *UL80a* y *UL80.5*.^(3, 8-12)

La envoltura del virión tiene dos complejos de glicoproteínas.^(13, 14)

1. Compuesta de uniones covalentes procesados proteolíticamente en dímeros, una es la glicoproteína B (gB), codificadas por el gen *UL55*, la cual es una proteína de superficie y blanco principal para neutralizar anticuerpos del hospedero.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾
2. Compuesta por productos de los genes *UL75*, *UL115* y *UL74* llamadas gH, gL y gO, respectivamente.^(18,19) El complejo de estas glicoproteínas juega un papel crítico y no entendido completamente su participación en el inicio de la infección.

2.1.1. PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE

Las MCP del CMVH contiene 1,370 aminoácidos, la proteína pUL86 es conservada entre las proteínas de los herpesvirus comunes y forma el mayor componente de los pentámeros y hexámeros de la cápside. Dos más pequeñas y menos abundantes son las mCP con 360 aminoácidos (pUL85) y las mC-BP con 290 aminoácidos (pUL46) asociadas en una relación 2:1 en forma de tripletes.^(20, 8, 12)

Las SCP contienen 75 aminoácidos pUL48.5 ó pUL48/49, no han sido caracterizadas mediante análisis de microscopia electrónica.^(20, 21) Y con 708 aminoácidos la proteína codificada por *UL80*, dando lugar al menos a tres proteínas diferentes que realizan distintas funciones en el ensamblaje de la cápside. Las proteínas más abundantes son llamadas AP y son derivadas de la porción carboxilo del gen *UL80.5* mediante eventos de ensamblajes autos catalíticos, ensambles de serina de 30 kD como ensamble mediante proteasa maduracional.^(22, 23)

2.1.2. GLICOPROTEÍNAS DE LA ENVOLTURA

La envoltura del CMVH contiene proteínas virales derivadas de lípidos de las membranas intracelulares del huésped. La obtención de la envoltura y la asociación de glicoproteínas ocurren en ambos sitios, núcleo y citoplasma. La envoltura de glicoproteínas es un blanco importante para los anticuerpos del hospedero en el mecanismo inmune.^(13, 24,14) Estudios recientes revelaron que aproximadamente hay ocho diferentes especies de glicoproteínas en la envoltura del virus, una de ellas es gB (gpUL55), siendo una de las proteínas más abundante de la envoltura, a demás es un blanco principal para neutralizar anticuerpos del hospedero.^(25-29, 30, 31) Los homólogos de gB juegan un papel esencial en la unión a receptores y fusión celular⁽¹³⁾

La glicoproteína B se encuentra en todas las membranas de células infectadas y se incorpora al virión cuando se efectúa el envoltamiento.⁽³²⁾ Son abundantes, conservadas e inmunogénicas y es la glicoproteína de envoltura más estudiada, las gB han sido las principales candidatas para el desarrollo de vacunas contra el CMVH.^(33, 34) El análisis de la secuencia de ADN reveló que existen cuatro distintos genotipos de gB en circulación.⁽³⁵⁾ La existencia de estos genotipos ha demostrado utilidad en estudios epidemiológicos.⁽³⁶⁾

2.1.3. PROTEÍNAS DEL TEGUMENTO

Por lo menos, se localizan 25 proteínas en la capa del tegumento entre la cápside y la envoltura del virión.⁽²²⁾ Los productos de 11 *ORF's*, son los siguientes genes *UL25, UL26, UL32, UL47, UL48, UL48.5, UL82, UL83, UL85, UL88, UL99*, se descubrieron cuando los polipeptidos de cuerpo denso del virión se separaron electroforéticamente y todos parecen ser fosforilables y altamente inmunogénicos. Los *ORF's* son todos conservados en betaherpesvirus⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ y sólo un número pequeño son conservados en herpesvirus comunes.

Dos proteínas del tegumento, pp150 (ppUL32 ó fosfoproteína básica) con 1,048 aminoácidos (150 a 155 kD) y pp65 (ppUL83 ó proteína de la matriz inferior) con 561 aminoácidos (65 a 68 kD), son blancos principales para los linfocitos T CD8⁺, son las proteínas más abundantes del virión formadas durante la replicación viral.^(4, 6)

Gran cantidad de la proteína pp65 del virus es producida por cepas de laboratorio y asociada a la producción de abundantes cuerpos densos.

El antígeno pp65 es blanco principal del ensayo de antigenemia, este ensayo es usado para ayudar a un rápido y oportuno diagnóstico del CMVH en infecciones clínicas. Aunque todas las proteínas del tegumento son fosforiladas, pp65 es el mayor aceptor de fosfatos en células infectadas, siendo también blanco principal para la fosforilación *in vitro* por la asociación de la proteína cinasa al virión.^(41,42)

Otra fosfoproteína abundante del tegumento es pp150 (ppUL32 ó fosfoproteína básica)^(4, 41) codificada por el gen *UL32*.⁽⁴³⁾ Está incorporada principalmente dentro de los viriones, forma los cuerpos densos y se estima que constituye un 20% de la masa del virión.⁽⁴⁴⁾ La pp150 también es blanco para la fosforilación por la asociación de la proteína cinasa al virión.⁽⁴¹⁾

De igual forma pp150 es un antígeno viral reconocido ampliamente, detectándose en un 85 a 90% en suero de pacientes seropositivos a CMVH,⁽⁴⁵⁾ resultando la inclusión en recombinación de proteínas basado en ensayos serológicos.⁽⁴⁶⁾

Varias proteínas adicionales se han identificado como probables componentes del tegumento. La fosfoproteína llamada pp71 (ppUL82 ó proteína de matriz superior), funciona como transactivador de expresión de genes.⁽⁴⁷⁾ Otra llamada ppUL69, también es un transactivador asociado al tegumento.⁽⁴⁸⁾

2.1.4. Gen *UL83* que codifica para la fosfoproteína pp65 [(ppUL83) proteína de la matriz inferior]

La fosfoproteína pp65 es el componente principal de las partículas de CMVH. ⁽⁵¹⁾ y se confieren al núcleo de células en el inicio de una infección lítica. ⁽⁵²⁾ La proteína es blanco de la inmunidad humoral, celular y principal objetivo de antígenos de los linfocitos T citotóxicos. ^(53, 54) La persistencia de esta proteína viral en presencia de una fuerte vigilancia inmune implica una importante función durante el ciclo viral.

Sorprendentemente, el gen *UL83* es completamente prescindible para la reproducción en los cultivos de fibroblastos, y es esencial para la formación cuerpos densos. ⁽⁵⁵⁾

Muchos genes de CMVH no requeridos para la replicación *in vitro* del virus ayudan a modular o evadir el sistema inmunitario, estos genes y pp65 han sido implicados en la lucha contra la respuesta innata y adaptativa. Se encontró que pp65 sirve para mediar la fosforilación de las proteínas virales antigénicas inmediatas tempranas (*Inmediate Early Antigen*, IEA) que bloquea su presentación en las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I. Además de estas alteraciones en la inmunidad adaptativa, pp65 también protege a las células infectadas contra la inmunidad innata mediante la inhibición de las células *Natural Killer* citotóxicas a través de una interacción con el receptor que activa a NK p30. ⁽⁵⁶⁾

El rápido transporte de pp65 al núcleo, indica que puede tener una función importante en la iniciación de la expresión de genes y replicación viral.

3. MULTIPLICACIÓN

La infección por CMVH es de especie específica. Se replica sólo en células humanas y es dependiente del tipo celular. Después de infectar a su blanco el CMVH utiliza las células epiteliales de la orofaringe como sitio de reproducción primaria, de allí se disemina por vía linfática a los leucocitos causando viremia e infección de órganos distantes llegando a instalarse en los diferentes tipos celulares. El CMVH al infectar las células produce un agrandamiento en ellas de hasta cuatro veces su tamaño normal (citomegalia), rodeadas de un halo intranuclear que les da la característica de “ojo de búho”.⁽⁵¹⁾

⇒ ***In vitro***. Líneas semicontinuas de fibroblasto MRC-5 o WI-38 de pulmón embrionario humano son células sensibles y productivas.

⇒ ***In vivo***. Son infectados diferentes tipos celulares. Entre ellas, células epiteliales glandulares (riñón, hígado, glándulas salivales, epitelio digestivo, parénquima pulmonar, páncreas), células musculares, óseas, endoteliales, monocitos, linfocitos activos. El CMVH infecta a la mayoría de las membranas de todos los órganos y las células resistentes del sistema nervioso central (SNC).^(58, 59)

En los procesos de replicación y transcripción ocurre la síntesis de proteínas virales que sigue un esquema de cascada. El ciclo de replicación del virus es el más largo entre los herpesvirus, de 96 a 120 h aproximadamente.

Expresión genética viral de los herpesvirus.

La transcripción viral es iniciada por una proteína activadora-trans, forma parte del tegumento. A esta proteína se la conoce como activador-trans de los genes alfa, gen *UL48* (VP16), la cual activa la transcripción de los genes inmediatos-tempranos virales, actuando conjuntamente con algunos factores de transcripción celular, como el factor de proliferación endógena.

La presencia ó ausencia de este factor es críticos en determinar cuándo los herpesvirus expresa los genes líticos ó al contrario cuándo establecen una infección latente.⁽⁵⁸⁾

1.- Genes inmediatos-tempranos ó genes alfa (*Immediate Early Antigen*, IEA); los cuales se expresan en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. En su mayoría son proteínas regulatorias que activan a otros genes virales y su vez inducen el ensanchamiento de la célula y regulan las transcripciones.

2.- Genes tempranos, (*Early Antigen*, EA), aparecen entre la 2ª y la 24ª h. Se fabrican antes de la replicación del ADN viral, actuando como enzimas que participan en el metabolismo del ADN; como la timidina cinasa (TK) y la ribonucleótido-reductasa (RR) y enzimas que actúan directamente en la replicación del ADN; como la ADN polimerasa y la ADN helicasa.

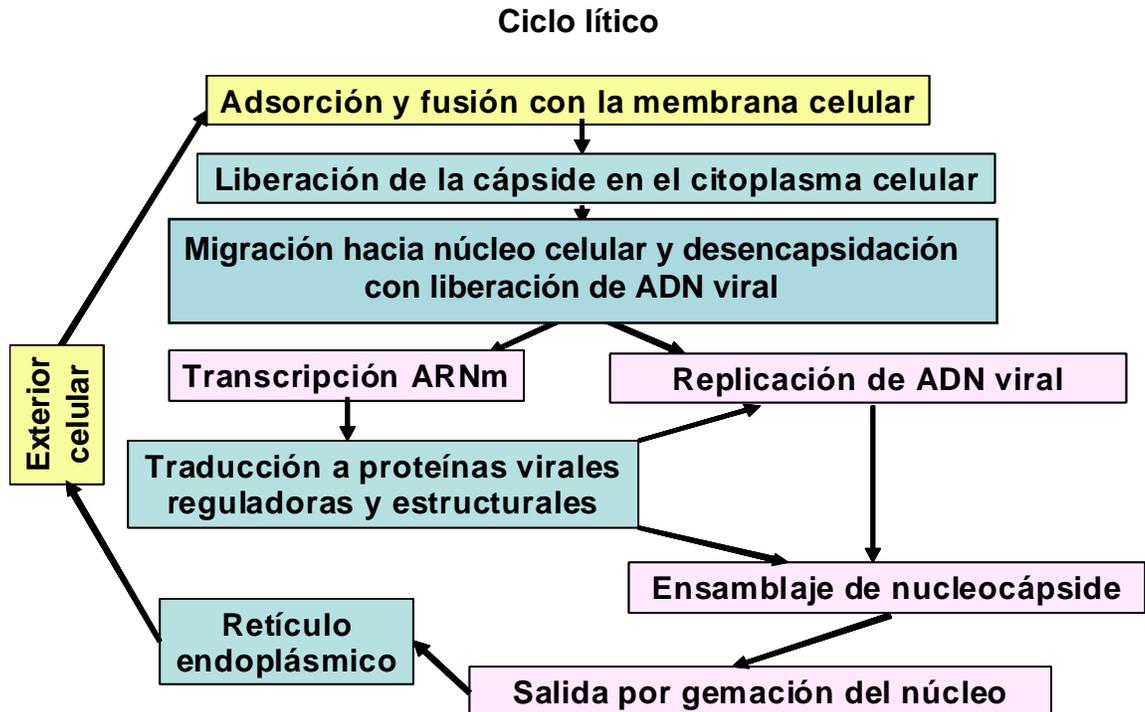
3.- Genes tardíos (*Late Antigen*, LA), se producen después de que se ha replicado el ADN. Incluyen proteínas estructurales, requeridas para producirse las partículas virales, lo mismo que el VP16 que son incorporados al tegumento viral. Un gen tardío interesante produce el gamma 1-34.5, un factor de virulencia. Esta proteína no es necesaria para la replicación viral en algunas líneas celulares en los cultivos de tejido, pero es necesaria para la replicación en las líneas celulares de origen neuronal, en las cuales, éstos mutantes de delección disparan una respuesta de estrés que produce una parada total y prematura de toda la síntesis proteica. ⁽⁵⁸⁾

3.1. REPLICACIÓN VIRAL

La unión y penetración del CMVH en células blanco es un proceso rápido. Una de las glicoproteínas de envoltura se une a la célula del hospedero, lo que facilita la entrada. La entrada del virus es el resultado de la cascada de interacciones entre proteínas virales y celulares, culminando en la fusión de la envoltura del virión con la membrana plasmática celular. Posteriormente, la cápside y el tegumento son liberados al citoplasma, ocurriendo una rápida translocación al núcleo. La formación de la cápside y el empaquetamiento de ADN viral ocurren en el núcleo.

En seguida, la cápside adquiere su envoltura primaria al contacto con la capa interna de la envoltura nuclear, misma que pierde al fusionarse con la capa externa de la estructura. Una vez en el citoplasma continúa la maduración al rodearse con el tegumento. Finalmente, la envoltura que rodea a las dos capas se adquiere cuando el virión penetra las vesículas del aparato de Golgi. (Esquema. 1)

Las partículas ya maduras son transportadas a la superficie de la célula. La progenie del virus se acumula en el citoplasma, posteriormente se liberan al espacio extracelular. Esto ocurre aproximadamente a las 72 h después de una infección primaria. ^(59, 60, 49) La infección puede ser lítica, productiva y/o latente misma que puede ser reactivada cuando falla el sistema inmune.



Esquema 1. Diagrama de flujo del ciclo lítico del CMVH. Primero ocurre la adsorción y fusión de la partícula viral dentro de la membrana celular. Segundo hay liberación de la cápside, migración hacia el núcleo donde se libera el ADN del virus, ocurriendo dos eventos: 1) replicación de ADN y 2) transcripción de ARNm. En la transcripción de los ARNm virales se originan dos grupos de proteínas que siguen dos caminos: 1) replicación viral y 2) ensamblaje de la nucleocápside. En este punto, se enlaza la transcripción y replicación virales, posteriormente ocurre la salida del núcleo por gemación.

4. INFECCIONES HUMANAS

Fisiopatología. Durante el curso natural de la infección por CMVH ocurre una primoinfección seguida de etapas de infección latente con períodos de reactivación o reinfección. Una persona infectada con una cepa del CMVH puede reinfectarse con otra cepa diferente. **Figura 3.**

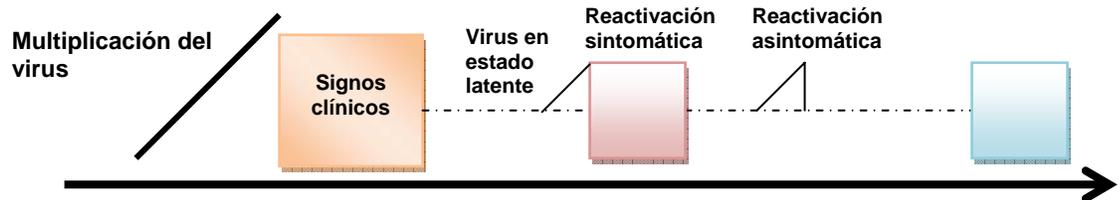


Figura 3. Después de una primoinfección, acompañada o no de signos clínicos la replicación viral se detiene pero el virus no se elimina del organismo, persiste en estado latente. A partir del estado de latencia pueden presentarse reactivaciones endógenas con producción de virus y aparición o no de signos clínicos de manera repetitiva. Tomada de: Virologie. Médicale, A. Mammette, Edition C, et al.14 a edición, 1992.

4.1. INMUNOPATOLOGÍAS ASOCIADAS A UNA INFECCIÓN

El CMVH es un patógeno importante para los “individuos inmunocomprometidos”, con VIH-1 ó 2+/SIDA, los receptores de trasplante de órgano(s) sólidos, médula ósea, cáncer, sepsis y neonatos, ya que son blancos importantes para reactivaciones y para desarrollar enfermedades inflamatorias asociadas a ésta. ⁽⁶¹⁾

INFECCIÓN PRIMARIA: Presenta neutropenia, trombocitopenia y seguida por un período asintomático. ⁽⁶²⁾ Aunque el virus persiste de por vida. La inmunidad celular protege de reactivaciones pero raramente erradica al virus.

INFECCIÓN LATENTE: Caracterizada por secreción viral intermitente, fluctuación en la tasa de anticuerpos, episodios de viremia recurrente en un individuo en el curso de su vida. El ADN del CMVH permanece en leucocitos periféricos, células madre de la médula ósea, células retículo endoteliales, macrófagos, células epiteliales y glandulares.

REACTIVACIÓN: La mayoría de las enfermedades asociadas al virus son resultado de reactivación de virus latente ó persistente adquiridos antes de la inmunosupresión. Las reactivaciones se producen frecuentemente en: reacciones alogénicas (transfusión abundante de sangre, trasplante), afección del sistema inmune, especialmente en caso de déficit de la inmunidad celular o terapéutica inmunosupresora. ⁽⁶²⁾

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

A la infección causada por CMVH se le conocía como infección grave diseminada o enfermedad de inclusión citomegálica (EIC), caracterizada por la presencia de calcificaciones intracerebrales, apnea, hepatoesplenomegalia, coriorretinitis, trombocitopenia, exantema, anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia, viruria al nacer y diversos deterioros estructurales y funcionales de órgano(s). Si se presenta una infección durante la gestación, puede provoca la EIC, ^(63, 64, 65) abortos, niños muertos al nacer, muertes postnatales por hemorragia, anemia hemolítica, lesión del hígado o del SNC.

La intensidad en el transcurso de la enfermedad es variable. Una infección congénita se presenta de dos formas:

- ⇒ **Forma sintomática:** se presenta en el 10% de los neonatos infectados y se asocia con secuelas neurológicas en más de la mitad de ellos. ⁽⁶⁶⁾
- ⇒ **Forma asintomática:** se presenta del 10 al 17%, desarrollando secuelas neurológicas a largo plazo, incluyéndose retraso mental y más frecuentemente hipoacusia sensorial. ⁽⁶⁶⁾

Los recién nacidos (RN) sintomáticos se caracterizan por compromiso de múltiples órganos, principalmente del sistema reticuloendotelial y SNC. Las anormalidades mas frecuentemente encontradas en la infección sintomática son:

- Prematuridad
- RCIU
- Petequias
- Púrpura
- Hepatoesplenomegalia
- Ictericia

Compromiso neurológico, como microcefalia, letargia, hipotonía.

Secuela sensorial, la más común en una infección congénita es hipoacusia sensorial.

Defectos oculares, una de las anormalidades más común es la coriorretinitis, seguida del estrabismo, atrofia óptica, microftalmos y cataratas. ⁽⁶⁶⁾

En los estudios de laboratorio puede encontrarse trombocitopenia, anemia hemolítica, aumento de proteínas en líquido cefalorraquídeo, hiperbilirrubinemia con bilirrubina directa >2 mg/dl y aumento en las transaminasas hepáticas. La magnitud del daño prenatal es medida por la presencia de microcefalia con ó sin calcificaciones cerebrales, RCIU y prematuridad. ⁽⁶⁶⁾

La mortalidad para estos pacientes es del 30%, ocurriendo la mayor parte durante el periodo neonatal, usualmente causada por falla multiorgánica, coagulación intravascular diseminada e infecciones bacterianas. La muerte durante el primer año se debe a una falla hepática progresiva y posterior a esta edad, a un gran compromiso neurológico, mal nutrición y neumonía aspirativa. ⁽⁶⁶⁾

6. RESPUESTA INMUNE CONTRA CMVH

La defensa inicial contra la invasión viral comienza con la respuesta inmune innata incluyendo diferentes citocinas con propiedades regulatorias de la respuesta inmune (celular y humoral) antiviral, también las citocinas pueden tener efectos antivirales directos, tal es el caso del factor de necrosis tumoral- α alfa (TNF- α) e interferón- γ gama (IFN- γ) que actúan sobre las células infectadas impidiendo la replicación viral (**Figura 4**). Las citocinas tipo I, participan como moléculas efectoras antivirales en la respuesta por células T contra las infecciones virales.⁽⁶⁷⁾

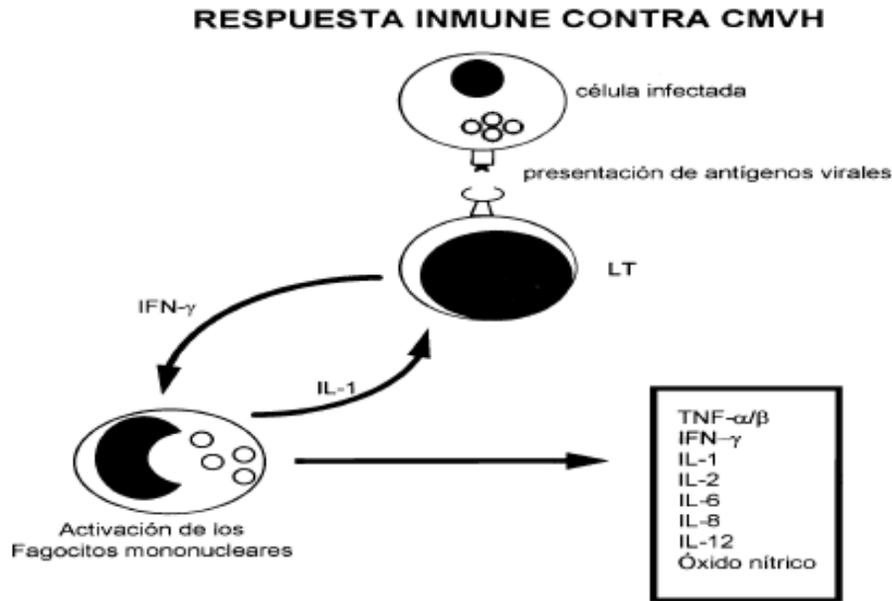


Figura 4. Las proteínas virales son procesadas en el citoplasma de la célula infectada, generando péptidos que son presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I a los linfocitos T, los cuales liberan IFN- γ al microambiente para activar a los macrófagos quienes secretan citocinas tipo I y óxido nítrico. Tomado de: José D'Artagnan Villalba-Magdaleno, *et al.*, 2000 Revista Biomédica Vol. 11/N. 4/Octubre-Diciembre.

Las citocinas IL-1, TNF- α , IFN- γ e IL-12 son algunas de las que están implicadas en reducir y controlar la replicación viral. Sin embargo, la funcionalidad de estas continúa aún después de cumplir sus funciones en la activación de células T CD8+ que participan en la eliminación del virus y de esta manera las citocinas generan la patogénesis indirectamente.⁽⁶⁸⁾

El TNF- α e IFN- γ se reconocen por tener actividad inmunomoduladora y antiviral en el control de la infección del CMVH, Pomeroy científico que realizó un experimento donde implementa el tratamiento con IFN- γ exógeno en ratones infectados con CMVM y explicó que dos días después de iniciar la infección, tuvo un efecto protector a dosis bajas, mientras que la terapia con IFN- γ incrementó la morbilidad y mortalidad cuando se emplearon altas dosis⁽⁶⁸⁾, por lo tanto el IFN- γ tiene un papel muy importante en la respuesta inmunológica en contra el CMVM y presenta efectos benéficos y adversos dependientes de la dosis y tiempo.

7. MODOS DE TRANSMISIÓN

1. Por contacto directo, en portadores asintomáticos se transmite por secreciones cervicales, esperma, orina, leche materna, lágrimas.
2. Por vía transplacentaria de la madre al hijo. En el curso del embarazo, la infección puede ser transmitida *in útero*.
3. Por vía perinatal los RN pueden adquirir el virus por el canal del parto o durante la lactancia.
4. Por vía faríngea o genital (la prevalencia de seropositividad es muy elevada entre homosexuales y heterosexuales con varias parejas).
5. Por la sangre (transfusiones).
6. Trasplante de órgano(s) cuando estos provienen de donantes seropositivos. ^(49, 69)

8. EPIDEMIOLOGÍA

El CMVH es un virus de amplia distribución mundial. El humano ha sido el único reservorio encontrado hasta el momento, la prevalencia de anticuerpos IgG contra el virus se incrementa con la edad del paciente pero puede ser influenciada por la zona geográfica, estado socioeconómico y cultural, encontrándose el 95% de prevalencia en adultos de países en vías desarrollo y del 40 al 60% en países desarrollados. ⁽⁷⁰⁾

Estas diferencias son marcadas principalmente durante la infancia, datos de Suramérica y África señalan una seroprevalencia en niños preescolares del 95 al 100% en comparación con países como Inglaterra o Estados Unidos en donde este grupo de edad no sobrepasa el 20%. ^(70, 71)

Incidencia de una infección primaria en neonatos

El 40% de los neonatos nacidos se infectan por CMVH

30% son asintomáticos (5 al 10% tendrán pérdida de audición)
10% son sintomáticos (2 al 3% mortalidad y 8% secuelas neurológicas)

Incidencia de infección en receptores de transplante de órganos

Del 80 al 90% de los pacientes adquieren una infección por CMVH

Primoinfección 60%
Reactivación 10%
Sobreinfección 20%

30% son asintomáticos (25% producen rechazo al injerto y 20% le provoca la muerte)
Clínicamente provocan mononucleosis, neumonitis, hepatitis, enfermedades gastrointestinales

Incidencia de infección por CMVH en pacientes inmunosuprimidos.

La incidencia de infección que presenta un paciente inmunosuprimido es del 60 al 90% ⁽⁷²⁾

59% problema hepático
65 al 93% cardíaco
20% medula ósea
90% pacientes infectados con VIH-1 ó 2+/SIDA

50% viremia.
90% diseminada (Necropsia)

9. DETECCIÓN EN EL LABORATORIO

Situaciones en las que es necesaria la detección en el laboratorio

- ⇒ Determinación del estado inmune frente al virus en donantes y receptores de órgano(s).
- ⇒ Conocimiento de la susceptibilidad a la infección en pacientes de alto riesgo (transplantados).
- ⇒ Guía de inicio del tratamiento anticipado en transplantados (terapia preventiva).
- ⇒ Diagnóstico diferencial de la infección en el neonato.
- ⇒ Como ayuda en el diagnóstico diferencial de la enfermedad.
- ⇒ Como monitoreo de la eficacia del tratamiento antiviral específico.
- ⇒ Detección de la resistencia a los antivirales.
- ⇒ Encuestas sero-epidemiológicas en la población o en grupos poblacionales. ⁽⁷³⁾

9.1. Métodos directos

9.1.1. Detección del virus

La infección del CMVH se puede observar en el microscopio óptico por preparaciones citológicas e histológicas. Observándose células gigantes con una inclusión intranuclear en forma de "ojo de pescado o de búho" (las células se redondean y aumentan de tamaño). Esta técnica puede presentar falsos positivos. Obteniéndose de muestras de orina de RN, líquido amniótico, lavado bronquio alveolar y biopsia de órgano infectado. ⁽⁷⁴⁾

9.1.2. Detección directa de antígenos por inmunomarcaje

La sensibilidad y especificidad del examen microscópico puede aumentar por el uso de anticuerpos anti-CMVH, detectando antígenos del CMVH intranucleares por un método inmunocitoquímico. La detección de estos antígenos por las técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa se realiza mediante muestras de orina, aspirado bronquial, lavado bronquio alveolar, leucocitos y biopsias. Estas metodologías tendrán alta especificidad si usan anticuerpos monoclonales anti-CMVH marcados con un fluorocromo ó enzima. ⁽⁷⁵⁾

9.1.3. Detección del virus o de su estructura RT-PCR

Existen técnicas moleculares, entre ellas NASBA (*Nucleic acid sequencing-based assay*) y la PCR. La amplificación isotérmica NASBA es utilizada en métodos comerciales (Nuclisens[®] CMV pp67, BioMérieux) donde el blanco a amplificar no es el ADN del virus sino el ARNm del gen que codifica para la proteína pp67 producida durante la replicación. Con ello se pretende diferenciar la infección activa con la multiplicación del virus de latencia. Ventajas, accesibilidad a diversos laboratorios, familiaridad con la metodología y como desventaja, difícil interpretación, etc. Actualmente, se ha cambiado el sistema de detección por otro que utiliza tecnología en *tiempo real*. ^(76, 77)

9.1.4. Prueba de antigenemia

Consiste en detectar la presencia de antígenos del CMVH en los leucocitos extraídos de sangre de pacientes con sospecha de infección activa por el virus, utilizando tinciones inmunofluorescentes o inmunoenzimáticas, habitualmente las primeras. La antigenemia presenta una serie de ventajas teóricas, como su estandarización, largo procedimiento, la obtención de resultados es de 4 o 6 h. ^(78,79)

Recomendaciones para conseguir resultados óptimos:

- ⇒ EL antígeno idóneo es la fosfoproteína de matriz de 65 kD (pp65). Existen en el mercado diversos anticuerpos (Chemicon, Argene-Biosoft, BioRad, etc.).
- ⇒ La fijación de las preparaciones se hace con formaldehído.
- ⇒ Un aspecto fundamental es la rapidez de procesamiento, ya que el antígeno pp65 es lábil, por lo que se aconseja no demorarse más de 18 h, preferiblemente dentro de las 4 h después de la toma de la muestra (esto puede representar un problema en laboratorios con recursos limitados o para aquellos que deriven muestras a laboratorios de referencia).
- ⇒ Los mejores resultados en sensibilidad y precisión se obtienen sobre una preparación con 2×10^5 leucocitos.
- ⇒ La precisión es aceptable entre 10 y 250 células CMV⁺ /preparación. Más allá de este límite superior resulta extremadamente difícil realizar recuentos reproducibles y tampoco es clínicamente necesario. ^(79, 80)

9.2. Métodos indirectos

9.2.1. Búsqueda de anticuerpos

La infección primaria provocada por CMVH, se acompaña de una respuesta humoral típica. Los primeros anticuerpos en producirse son las IgM de 7 a 12 días, seguidos por una respuesta de las IgG de 2 a 3 semanas, frente a diferentes proteínas del virus. Estos últimos anticuerpos permanecen de por vida, mientras que las IgM persisten de 3 a 4 meses.

Fijación del complemento (FC): método clásico para la detección de las IgG, pero su laboriosidad y sensibilidad analítica son limitaciones graves para la realización de la técnica.

Inmunofluorescencia (IF): método que utiliza como fuente de antígenos, microcultivo del virus. Permite detectar las IgM e IgG, es más sensible que FC, produce falsos positivos, ya que el CMVH induce la expresión de receptores FC en la superficie de las células infectadas que reaccionan de forma inespecífica con las IgG. Para evitar esto, existe la variante denominada fluorescencia anticomplementaria (ACIF), siendo un método de referencia para la detección de las IgG. Sin embargo, su complejidad y laboriosidad la circunscriben a laboratorios de referencia.

Partículas de látex: son sensibilizadas para detectar anticuerpos anti-CMVH por aglutinación. En el mercado existen varias: CMVscan[®], Becton-Dickinson. La técnica es rápida de 5 a 10 min, sencilla, fácil lectura, sensibilidad elevada, incluso superior a la IF, siendo una técnica de gran utilidad para una detección serológica pretransplante de donantes y receptores, así como para conocer el estado inmune del paciente. ⁽⁸¹⁾

Las técnicas indirectas presentan falsos negativos por competición con las IgG, especialmente en presencia de un título elevado de éstos. También pueden producirse falsos positivos por la presencia del factor reumatoide que reacciona inespecíficamente con otras IgG. ⁽⁸²⁾

9.2.2. Métodos basados en Cultivo

El CMVH es un virus con gran especificidad de especie y sólo las células diploides humanas permiten el crecimiento *in vitro*. Las más utilizadas son las líneas semicontinuas de fibroblastos MRC-5 o WI-38 de pulmón embrionario humano. El cultivo convencional suelen inocularse en tubos de cultivo celular y la positividad se detecta mediante la observación del efecto citopático característico. Su detección suele ser en 10 días pero puede prolongarse de 15 a 20 días. ⁽⁶⁰⁾

El método de cultivo *Shell Vial* (SV) ha permitido prevenir alguno de los inconvenientes del cultivo en tubo y con ello avances innegables en detección del CMVH. Detecta antígenos virales inmediato-tempranos mediante la utilización de anticuerpos monoclonales, en un cultivo sobre viales de fondo plano.

El método SV permite realizar la mayor parte de las detecciones en 24 h y algunos en 48 h. Para el revelado de los viales se puede utilizar una tinción fluorescente o enzimática. Existen diversos anticuerpos monoclonales (o mezcla de ellos) comerciales que detectan antígenos inmediato-tempranos por lo general la proteína de 72 kD. ⁽⁸³⁾

9.3. Métodos moleculares cuantitativos

Carga viral, existen dos tipos de tecnología aplicada para la determinación de la carga viral del CMVH.

⇒ La técnica de captura del híbrido (Hybrid Capture CMVH ADN Assay). Basada en la formación de un híbrido mixto en el ADN del CMVH, existe una lisis previa de la muestra y una sonda de ARN complementaria. Posteriormente, estos híbridos son captados por anticuerpos anti-híbrido de ADN-ARN fijados sobre las paredes de un tubo soporte de la reacción que se revela con la adición de un conjugado con fosfatasa alcalina que actúa sobre un substrato quimioluminiscente. Amplifica la señal original unas 3,000 veces. ⁽⁶⁰⁾

⇒ La PCR competitiva cuantitativa y cualitativa, COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics). Ensayo *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos para la cuantificación de ADN del CMVH en plasma humano con el analizador COBAS AMPLICOR™. Puede cuantificar el ADN del CMVH dentro de un intervalo de 600 a 100,000 copias de ADN del CMVH/ml de plasma (copias/ml). Ayuda a evaluar la respuesta viral frente al tratamiento antivírico mediada por los cambios en los niveles de ADN del CMVH. ^(83, 84)

10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En 1984, Kary Mullis ideó el método llamado PCR el cual amplifica secuencias específicas de ADN. La técnica tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un molde, fundamentándose en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, usa ciclos de temperaturas altas y bajas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación.

Posteriormente, se vuelven a unir las polimerasas a las cadenas de ADN recién formadas para duplicarse. Inicialmente, la técnica era bastante lenta, porque las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. **Figura 5.**

El descubrimiento de polimerasas termoestables simplificó el proceso, ya que se podía pasar de un ciclo a otro sin necesidad de realizar la reposición de las polimerasas. El ADN amplificado se coloca en un gel de agarosa y realiza un corrimiento electroforético y posteriormente se visualiza una banda con bromuro de etidio (BrEt) y luz ultravioleta (UV). ^(77, 78)

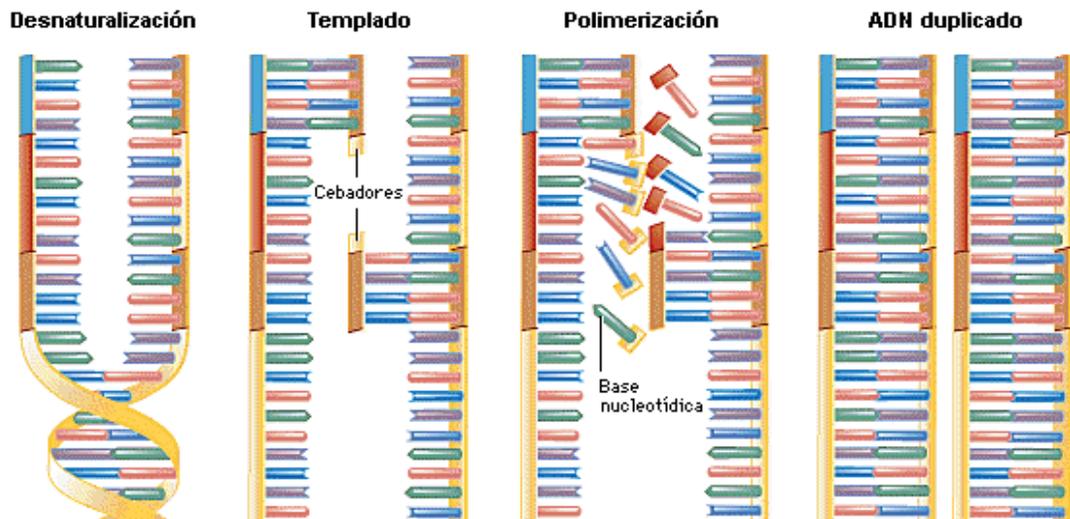


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR. La polimerasa multiplica rápidamente un pequeño fragmento ADN. Cada ciclo de PCR consta de tres fases. En la primera, ocurre **desnaturalización**, se calienta el ADN para separar las dos cadenas que la forman. En la segunda, ocurre una **hibridación de los iniciadores**, la temperatura de la mezcla se rebaja para que los iniciadores del ADN se enlacen en las cadenas separadas de esta molécula. En la tercera o **polimerización** se eleva de nuevo la temperatura para que la polimerasa copie rápidamente el ADN. En cada ciclo de la PCR se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen más de mil millones de copias de un solo fragmento. Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2003. © 1993-2002 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

11. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE LA PCR

En el desarrollo y estandarización de un sistema de PCR se optimizan una serie de parámetros críticos y se determinan parámetros imprescindibles que permitan plantear que el sistema diseñado sea confiable. ⁽⁸⁵⁾ En una reacción de amplificación incluye la secuencia blanco, la enzima ADN polimerasa, dos oligonucleótidos, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), el buffer de reacción y aditivos opcionales, todos son mezclados y colocados en un termociclador automático que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta. ⁽⁸⁶⁾

ADN molde

La correcta amplificación de la región de interés es dependiente de la cantidad y calidad del ADN molde. Los reactivos que se emplean normalmente para purificar los ácidos nucleicos (sales, guanidinio, proteasas, duodecil sulfato de sodio (SDS) y solventes orgánicos) son inhibidores potentes de las ADN polimerasas. ⁽⁸⁶⁾ Para ello existen una serie de reglas sencillas para que el ADN molde no sea un problema en la reacción:

1. Se debe garantizar su integridad, es decir no puede estar fragmentado en trozos más pequeños del que se desea amplificar.
2. La muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) ya que reducen la concentración de iones Mg^{2+} en la solución. ⁽⁸⁷⁾
3. No debe contener factores sanguíneos, fenol, detergentes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. ⁽⁸⁵⁾

Cuando se amplifica un gen de copia simple se emplean cantidades entre los 100 y 500 ng. En el caso de la amplificación de genes repetidos se puede reducir la cantidad a emplear entre los 10 y 50 ng. El mínimo oscila entre 10 y 100 ng y el máximo entre 400 y 500 ng. ⁽⁸⁸⁾

Elección y concentración de la enzima

Existen diferentes tipos de ADN polimerasa que llevan a cabo la replicación de ADN. Estas se pueden clasificar en: Termolábiles (Temperatura óptima de 37°C a 42°C, se desnaturalizan con el calor) y termoestables (Temperatura óptima de 74 °C, resiste entre 40 a 50 seg a 96°C). ⁽⁸⁸⁾

Una de las más utilizadas ha sido la Taq ADN polimerasa. ⁽⁸⁸⁾ Es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas, carecen de actividad 3'→5' exonucleasa, lo que las hace menos seguras a la hora de comparar las fidelidades.

Por ello hay que intentar obtener las mejores condiciones para garantizar su correcto funcionamiento, por lo que se recomienda no usar un alto número de ciclos, las concentraciones de los dNTP's deben ser iguales, disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa y la concentración de $MgCl_2$ debe oscilar entre 1.5 mM y 3.0 mM.⁽⁸⁹⁾ Se recomienda utilizar entre 1 y 1.25 U de enzima en 50 μ l de reacción. Incrementos en la cantidad de enzima y del tiempo de extensión generan la aparición de artefactos debido a la actividad exonucleasa intrínseca 5' \rightarrow 3' de la enzima.^(86,87)

Diseño y concentración de los iniciadores

Los iniciadores deben tener un tamaño entre las 18 y 30 pb. Se recomienda que el contenido de G+C oscile entre el 40 y 60%, evitando la presencia de regiones con largas secuencias de una sola base, así como secuencias que puedan producir estructuras secundarias internas. Los extremos 3' no deben ser complementarios, para evitar la formación de dímeros. Además, se debe evitar la presencia de tres G ó C cerca del extremo 3'.^(89, 90)

La temperatura de alineamiento (T_M) de los iniciadores debe ser similar en ambos, la cual generalmente oscila entre los 45 y 60°C. La secuencia de los iniciadores puede incluir en el extremo 5' sitios de corte para enzimas de restricción, lo cual dependerá del propósito de la investigación.^(91, 92) La concentración de iniciadores a emplear debe oscilar entre los 5 y 50 pmoles, para una concentración final de 0.1 y 1 μ M en 50 μ l de reacción.⁽⁸⁷⁾

Deoxinucleótidos trifosfato

Los dNTP's deben ser añadidos en la reacción en iguales concentraciones, puesto que los mismos pueden captar iones Mg^{2+} . Por lo general la concentración final más utilizada de dNTP's en un volumen de reacción de 50 μ l es de 0.2 mM.^(93,94)

Concentración de Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)

La concentración de magnesio es un factor crítico que afecta el funcionamiento de la enzima Taq ADN polimerasa. Los componentes de la reacción tales como: el ADN molde, agentes quelantes presentes en la muestra (EDTA o citrato), dNTP's y proteínas pueden afectar la cantidad de magnesio libre.⁽⁸⁷⁾ Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas.⁽⁹⁵⁾ Por tales razones resulta imprescindible determinar la concentración óptima de esta sal, la cual generalmente se encuentra en el rango de 1.5 a 3.0 mM.

Composición del buffer de reacción y aditivos

Por lo general el buffer de reacción 10 x está formado por 100 mM tris-HCl (pH entre 8 y 9 a 25°C), 500 mM KCl, 0.1% gelatina, 1% de Triton x-100 y 15 mM de $MgCl_2$.

El buffer tris se encarga de regular el pH de la reacción, el cual afecta la actividad y fidelidad de la enzima. ^(96,97) En ocasiones se hace necesario el uso de aditivos, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la PCR. La adición de betamina, dimetilsulfóxido (DMSO) y formamida es beneficioso cuando el ADN molde posee regiones ricas en GC y forma potentes estructuras secundarias del ADN que puede provocar que la polimerasa se detenga. ⁽⁹⁸⁾

El ADN con regiones ricas en GC puede ocasionar una ineficiente separación de las dos cadenas de ADN, por lo tanto la adición de aditivos en estos casos es benéfica, pues la betamina reduce la cantidad de energía requerida para separar las cadenas de ADN molde y el DMSO y formamida interfieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre ambas cadenas. También se pueden usar detergentes como el tween 20, laureth 12 (0.1%) o Tritón x-100, que ayudan a estabilizar la enzima.

Parámetros del programa de amplificación

Los dos parámetros que comúnmente se optimizan son la temperatura y el tiempo de alineamiento. Los tiempos y temperaturas del resto de las etapas usualmente no varían significativamente. ^(99, 100) Un tiempo de alineamiento de 30 a 45 seg es frecuentemente empleado. Si se incrementa de 2 a 3 min habrá una influencia negativa en la reacción, tiempos más largos suelen incrementar la probabilidad de aparición de productos inespecíficos. ⁽⁸⁵⁾

La Taq polimerasa tiene actividad reducida entre los 45 y 65°C, intervalos a los cuales son elegidas la mayoría de las temperaturas de alineamiento

El número de ciclos también es un aspecto importante a considerar. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de los factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos (normalmente se emplean de 25-35 ciclos) ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas. ^(87, 88)

Precauciones en la PCR

El ensayo de la PCR es muy sensible, por ello es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique obteniendo un resultado que no es real. Existen una serie de recomendaciones que ayudan a evitar las contaminaciones y la aparición de falsos positivos: lugar físico e instrumental exclusivo para la realización del ensayo, utilización de reactivos y tubos estériles, así como puntas resistentes a aerosol, uso de guantes, colocar controles de agua, además de colocar muestras negativas conocidas. ⁽¹⁰¹⁾

Para evitar la aparición de resultados falsos negativos, producidos generalmente por errores al pipetear y/o presencia de inhibidores, se recomienda emplear controles internos que compiten con la muestra problema. ^(102, 103)

12. SECUENCIACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GENOMA DE CMVH

Método enzimático de terminación de cadena o método de Sanger

La mayoría de los métodos de secuenciación automatizada son modificaciones del método desarrollado por Sanger. En este método el ADN secuenciado funciona como molde para la síntesis enzimática de ADN nuevo que comienza en un sitio definido por la unión de un iniciador. En la reacción se utiliza una mezcla de desoxinucleótidos y dideoxinucleótidos (Figura 6.) a concentraciones que crean una probabilidad finita de que un dideoxinucleótido se incorpore en lugar del correspondiente desoxinucleótido en cada posición de la cadena que está siendo sintetizada Figura 7.⁽¹⁰⁴⁾

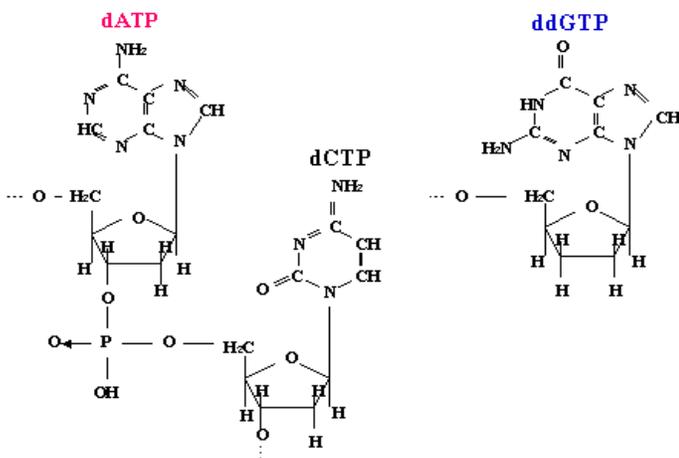


Figura 6. Fórmulas de deoxinucleotidos trifosfato (dNTP's). Dideoxinucleotidos trifosfato (ddNTP's) carecen de un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Tomada de: 1ª Reunión del Grupo de Trabajo en Retrovirus (GTR). MC Nogales.S.Microbiología.www.gtretovir.us.com/Reuniones/ponencias01/casos_clinicos/aportacionesII/mc_nogales.ppt

Para obtener la secuencia de las bases nitrogenadas de un segmento de ADN por el método enzimático de terminación de cadena, se necesitan los siguientes compuestos:

1. Segmento de ADN a analizar. Cantidad suficiente del fragmento a analizar. Se recomienda clonar el ADN viral en un vector apropiado, para obtenerlo puro y en mayor cantidad.
2. Enzima que replique el ADN. Normalmente las ADN polimerasas I del bacteriófago T₄. Esta enzima emplea como molde ADN de cadena sencilla y siguiendo las reglas de complementariedad de las bases nitrogenadas va añadiendo nucleótidos a partir de un iniciador.
3. Cebador. Oligonucleótido corto, alrededor de 20 bases de longitud necesario para que las ADN polimerasas I comience a añadir nucleótidos el extremo 3'-OH. Este cebador debe poseer una secuencia de bases complementaria a la del fragmento de ADN que se va a secuenciar.
4. Cuatro dinucleótidos trifosfatos. Adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

5. Nucleótidos didesoxi (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP). Los nucleótidos didesoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidróxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido en el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de ADN. ⁽¹⁰⁴⁾

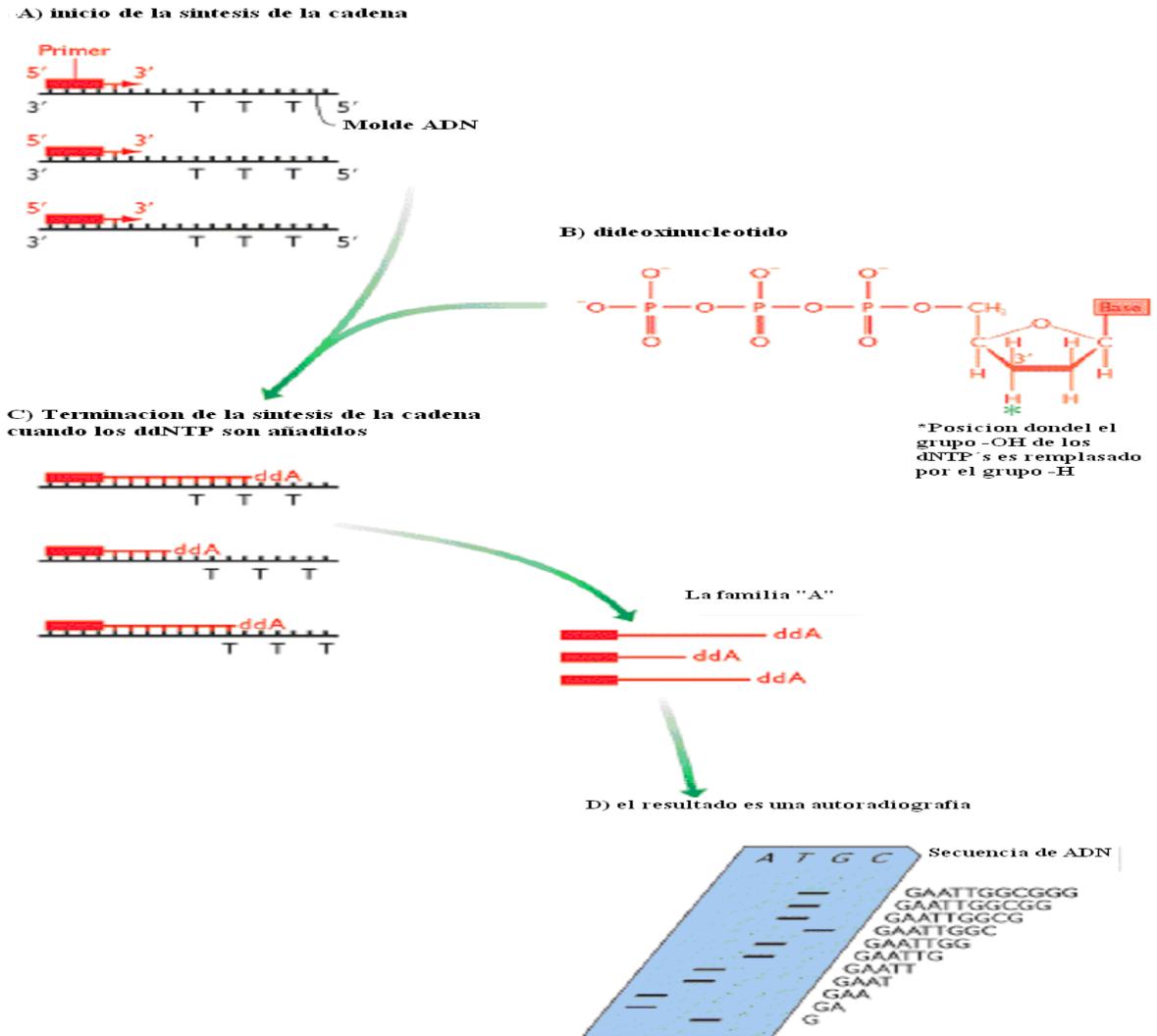


Figura 7. Secuenciación de ADN de una cadena de terminación.

A) La reacción involucra la síntesis de nuevas cadenas de ADN que son moldes de una sola cadena complementarias a esta.

B) La síntesis de la cadena no procede indefinidamente, porque la mezcla de reacción contiene cantidades pequeñas de dideoxynucleótido, que bloquea el alargamiento adicional porque tiene un átomo de hidrógeno, grupo oxhidrilo unido al carbón 3'.

C) La síntesis de la cadena es de ddATP resultando cadenas que se terminan enfrente de T_{5'} de los moldes. La familia "A" de cadenas terminadas se coloca en un carril del gel de poliacrídida, junto a las familias de cadenas terminadas de las reacciones T, G y C.

D) El patrón de bandas es visualizado en una autorradiografía, las cadenas terminadas se convierten en radioactivas por la inclusión de un dNTP etiquetado en las reacciones de la síntesis de la cadena. La secuencia, mostrada a la derecha, es leída observando qué carril de adentro de cada banda, empezando abajo de la autorradiografía y moviendo la banda por la banda hacia arriba. **NOTA:** El procedimiento descrito se realizaba en los inicios de la secuenciación, en la actualidad se realiza de manera automatizada y con marcaje no radioactivo. Tomada de: Biochemistry / Jeremy Berg, John Tymoczko, Lubert Stryer. 5th Ed.

12.1. PREPARACIÓN DEL ADN MOLDE

a) Obtención del ADN molde

La calidad de ADN molde es un factor importante para una secuenciación exitosa. Residuos de proteínas, ARN, sales, carbohidratos, cloroformo, etanol, detergentes, fenol, EDTA, etc. contribuyen mala secuencia.

Recomendaciones para obtener un molde de calidad:

Para obtener el ADN molde más puro es recomendable utilizar métodos de purificación con microcolumnas.

1. Si en la purificación de ADN se ha utilizado algún solvente orgánico como fenol o cloroformo, el ADN debe purificarse al menos dos veces mediante precipitación con etanol, para eliminar cualquier traza del solvente orgánico.
2. Si se utiliza etanol o isopropanol para precipitar el ADN, se debe realizar la precipitación utilizando acetato de amonio en lugar de acetato de sodio. Lavar el precipitado después de la centrifugación al menos una vez con etanol al 70%. Secar el precipitado y resuspenderlo en agua estéril.
3. Si se utiliza una minicolumna para la purificación de ADN, se recomienda centrifugar la columna dos veces después del paso de lavado y a continuación eludir el ADN con agua estéril. Este procedimiento también permite la eliminación del etanol presente en la solución de lavado de la muestra.

b) Productos de la PCR

1. El producto de la PCR debe visualizarse como una banda única en un gel de agarosa.⁽¹⁰⁴⁾

c) Cuantificación de ADN molde

La obtención de un buen resultado en la reacción secuenciación está determinada a una cuantificación precisa de ADN molde. Una pequeña cantidad de ADN en la reacción produce datos de secuencia con baja señal, ruido de fondo, errores y ambigüedades. Demasiado ADN molde produce efectos similares.

La cuantificación de la muestra es un paso previo de gran importancia. Se puede realizar mediante la medida de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro o cuantificar mediante electroforesis en gel de agarosa y comparar la intensidad de la banda con un marcador de masa ó concentración conocida. El corrimiento del gel de agarosa nos permitirá detectar otros posibles errores presentes en la muestra. Presencia de más de un amplificado o detección de dímeros de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación.

En la **Tabla 1** se muestra la cantidad de ADN necesario para cada tipo de molde, teniendo en cuenta que la cantidad estará sujeta a ajustes según se requiera.
(85)

Producto de la PCR:	Cantidad
100-200 pb	10 ng
200-500 pb	20 ng
500-1000 pb	30 ng
>1000 pb	100 ng
ADN cadena sencilla	100 ng
ADN cadena doble	250 ng
Cósmido, BAC	1 µg

Tabla 1. Cantidad de ADN molde utilizado en las reacciones de secuenciación respecto al producto de la PCR. Tomado de: Universidad de Valencia, Guía para la secuenciación automática de ADN. SERVICIO CENTRAL DE SOPORTE A LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL-S.C.S.I.E.

RESULTADOS EMITIDOS POR COMPUTADORA DE UNA SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA

En la **figura 8** se observa el resultado de una reacción de secuenciación emitido por la computadora donde se ilustra el orden de las bases puricas y pirimidicas de la secuencia amplificada mediante la detección de la fluorescencia de los fragmentos de los oligonucleótidos. Cada 1 de 4 mezclas que terminan se prepara con una etiqueta que despide luz fluorescente en una longitud de onda determinada.

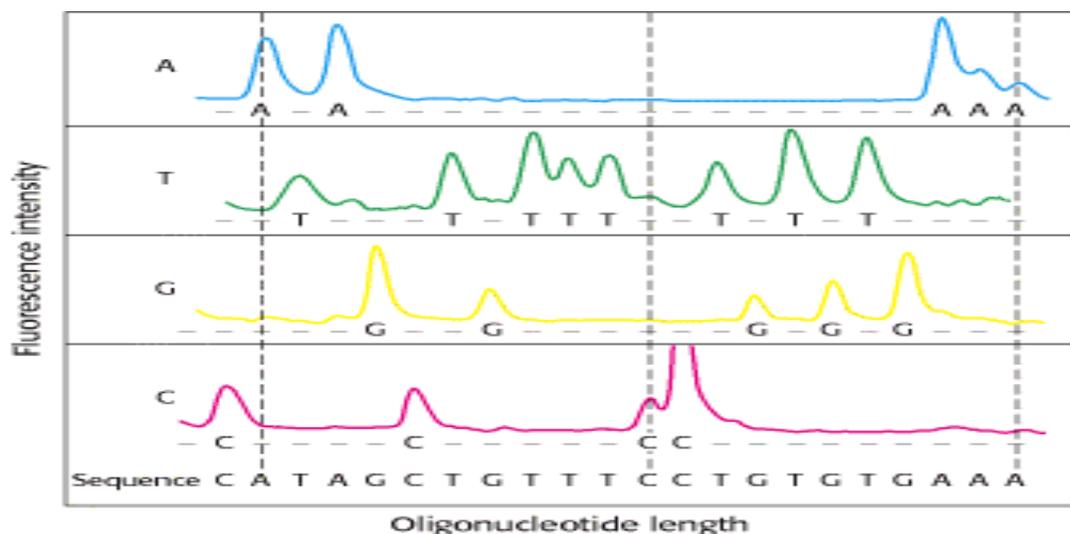


Figura 8. Representación de los resultados de secuenciación emitidos por PC. Cada 1 de 4 mezclas que terminan se prepara con una etiqueta que despide luz fluorescente en una longitud de onda, ejemplo: azul para A, verde para T etc. Tomada de: L.M. Smith, Kaiser R.J, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B.H. Kent, L.E. Naturaleza 321 (1986): 674.

13. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR

La tecnología de ADN recombinante es una técnica que permite introducir material genético foráneo en un individuo, y hace que éste organismo incorpore dicho material a su genoma y lo exprese como si fuera suyo. ^(105, 106) Esta tecnología se desarrolló a partir del descubrimiento de las enzimas de restricción ^(107, 108) y su acción sobre los ácidos nucleicos.

El principio de la tecnología de ADN recombinante se basa en la inserción de un fragmento de ADN foráneo ⁽¹⁰⁹⁾ en un hospedero ⁽¹¹⁰⁾ por medio de un vector de clonación que puede ser un virus o un plásmido. ⁽¹¹⁵⁾ Una vez que el fragmento de ADN foráneo se ha introducido en el hospedero, comienza el proceso de clonación molecular y recombinación, dando como resultado la expresión del gen o genes introducidos en un organismo diferente. ⁽¹¹⁴⁾

13.1. Enzimas de restricción: producción de fragmentos de ADN para recombinación

Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción fueron descubiertas por Werner Aber, Hamilton Smith y Daniel Nathans. ⁽¹¹³⁾ Éstas son específicas, catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos y son capaces de cortar ambas hebras de ADN en lugares específicos, creando de esta manera una serie de fragmentos. ⁽¹¹³⁾ La función de las enzimas de restricción es la proteger al organismo de AND extraño. Cuando una porción de ADN foráneo ingresa a la célula, las enzimas de restricción se encargan de degradarlo a pequeños fragmentos, siempre y cuando éste no esté modificado. ⁽¹¹⁴⁾ Actualmente se conocen unas 200 enzimas de restricción (las más conocidas se muestran en la **Tabla 2**). Se nombran de acuerdo al organismo del cual se extraen, por ejemplo *EcoRI* y *EcoRII*, que se extraen de *E. coli* o *HaeIII* que se extrae de *Haemophilus aegyptius*.

Enzima de restricción	Organismo de donde se extrae
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>HindII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcesens</i>
<i>BamI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>BglIII</i>	<i>Bacillus globiggi</i>

Tabla 2. Principales enzimas de restricción. De acuerdo a la especificidad se conocen tres tipos:

I. Cortan en un sitio cercano al sitio de restricción, a una distancia que varía aleatoriamente, por lo que no suelen emplearse para ADN recombinante.

II. Reconocen y cortan en la secuencia específica con alta precisión.

III. Similares al tipo II en cuanto a la precisión del lugar de corte, pero se diferencian de éstas porque sólo cortan entre nucleótidos del mismo tipo, por ejemplo entre dos adeninas. Tomado de: Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin r. W. Gelbart. 1998. Genética. 5º Edición, 2º reimpresión, editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 429-452, 456-479.

13. 2. Vectores de clonación

Una vez que se han aislado los fragmentos de ADN de interés por medio de enzimas de restricción, el siguiente paso es unirlos a vectores de clonación.

Los vectores de clonación permiten la unión de los fragmentos de ADN extraño a su propio ADN por medio de sitios de restricción compatibles, sin afectar su replicación por medio de un proceso de recombinación. ^(110, 108, 115)

El vector es el vehículo que transporta el gen o genes de interés al hospedero, que normalmente es una bacteria o una célula eucariota viva. Una vez dentro de la célula, el vector se multiplica produciendo varias copias idénticas del gen que transporta. ⁽¹¹⁵⁾ Para que un vector sea útil en la tecnología de ADN recombinante, debe recuperarse fácilmente de la célula hospedadora, además de no producir daños. Actualmente se conocen como vectores a plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, vectores transbordadores, células eucariotas y cromosomas artificiales, entre otros. ^(83, 108)

13.3. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario de carácter extracromosómico y tienen la capacidad de replicarse autónomamente. Además, transportan al gen o a los fragmentos de ácidos nucleicos de interés, los plásmidos transportan otros genes que le confieren propiedades importantes al hospedador, como la resistencia a ciertos antibióticos. **Figura 9.** ^(83, 108)

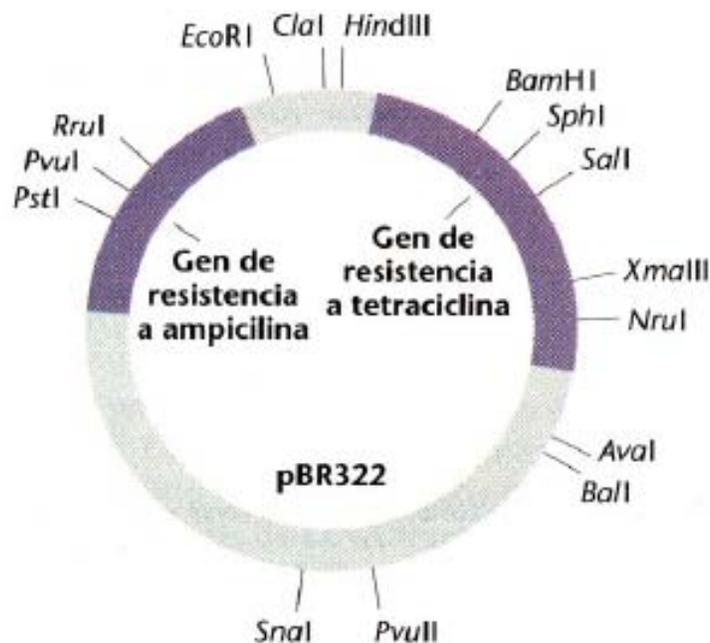


Figura 9. Representación esquemática del plásmido pBR322 con sus diferentes sitios de restricción. Tomado de: Klug, W. M. Cummings. 1999. Conceptos de Genética. 5ª edición, Editorial Prentice Hall, Madrid, pp 453–515.

13.4. Características que hacen adecuado a un vector de clonación

1. Debe ser pequeño
2. Estable cuando se encuentra dentro el hospedero
3. Que produzca muchas copias de él
4. Fácil de aislar en su forma súper enrollada
5. Pueda clonar fragmentos relativamente grandes
6. Que se conozca la secuencia completa de bases de él mismo
7. Que existan sitios de restricción únicos para las principales endonucleasas
8. Posea varios genes de resistencia a antibióticos
9. Fácil de introducir a los hospedero

13.5. Hospederos procariontas

El primer hospedero empleado para clonación de ADN mediante esta técnica y el más usado en la actualidad es *E. coli*. Se cuenta con información sobre su genoma y características fisiológicas. *E. coli* en su forma nativa produce retención de proteínas en el periplasma, haciendo difícil su aislamiento.

Para contrarrestar este problema se han desarrollado cepas modificadas de esta bacteria, *E. coli* mutantes para la biorremediación de ambientes contaminados con mercurio.⁽¹¹⁶⁾ Otra ventaja de *E. coli* es que puede aceptar una amplia gama de vectores, como plásmidos, bacteriófagos y cósmidos, entre otros.^(108 109)

13.6. Transfección y clonación de ADN

Una vez que se aísla el fragmento clonado se inserta en el vector y selecciona el hospedero adecuado, se debe proceder con la transfección del material genético para que comience el proceso de clonación de ADN.

La transfección de ADN incluido en el vector se debe hacer tomando en cuenta que la célula posee una barrera que la limita y escoge selectivamente qué sustancias penetrarán dentro de ella (membrana celular). Para superar esta barrera, se han diseñado las técnicas de transfección de sustancias, que se encargan de abrir poros en la membrana o inducir la endocitosis por vías naturales.⁽¹⁰⁹⁾

Estos procedimientos se dividen en técnicas de permeabilidad celular, microinyección y técnicas de transfección propiamente dichas. **Figura 10.**

Nota: En la transferencia intercelular de ADN y recombinación genética en bacterias; existen tres procesos: 1) transformación, 2) traducción y 3) conjugación, por lo tanto, la transformación solo ocurre en bacterias que son capaces de captar ADN de alto PM del medio.

CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

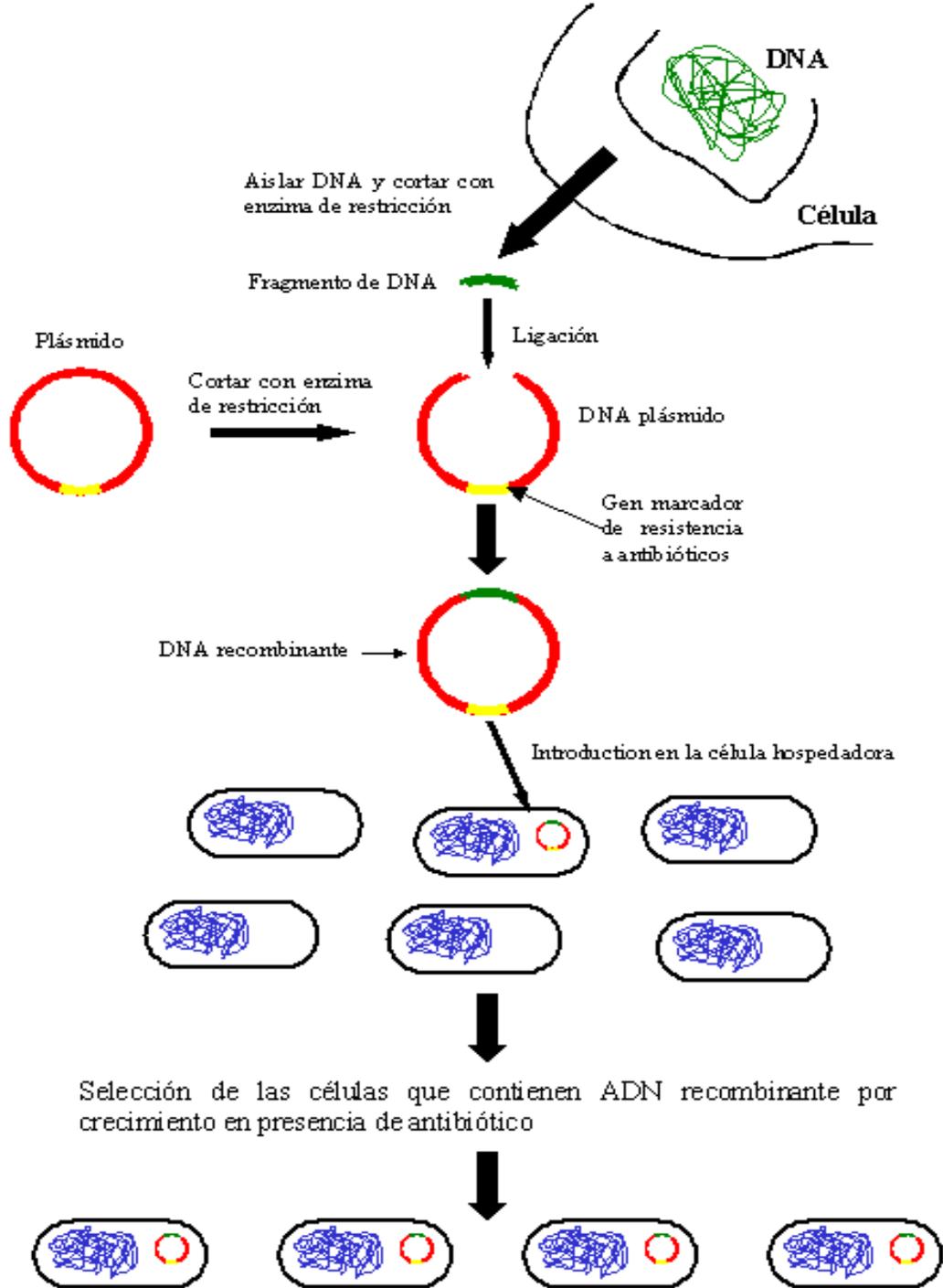


Figura 10. Obtención de ADN recombinante. Inserción de un fragmento de ADN en un plásmido e introducción de un plásmido recombinante en una célula bacteriana. Las bacterias que contiene el plásmido se seleccionan haciéndolas crecer en un medio que contenga un antibiótico. Solo sobrevivirán las bacterias portadoras del plásmido. Tomada de: Molecular Biology and Biotechnology. Principles and applications of recombinant ADN. B. R. Glick y J.J. Pasternack. ASM Press, 1998. http://www.uned.es/091279/ingenieria_genetica/tema3/DNA_recombinante_3.htm

II. JUSTIFICACIÓN

El CMVH es un patógeno vírico que produce un gran número de enfermedades dependientes del estado inmunológico del individuo, agregando que es el principal agente infeccioso causante de defectos congénitos, por lo que es necesario contar con métodos de detección y monitoreo de la infección cursada por este virus.

En pacientes inmunofuncionantes la detección se realiza por medio de las reacciones de los anticuerpos del individuo infectado, pero en los pacientes inmunocomprometidos esta metodología no es útil por la propia deficiencia inmunitaria.

Para los pacientes inmunocomprometidos existen varias pruebas de laboratorio que pueden ayudar en el diagnóstico de la infección. Por mencionar algunas la antigenemia que detecta la presencia de antígenos virales en leucocitos extraídos de la sangre de pacientes con sospecha de infección activa por el virus. Otra prueba es el aislamiento viral en cultivo *Shell Vial*, proceso laborioso y muy largo (30 días) porque es necesaria la propagación seriada antes de que el virus alcance cantidades elevadas, entre otras.

Estas pruebas cuentan con ciertas desventajas; una de las dificultades que presenta la técnica de antigenemia es el requerimiento de un número elevado de leucocitos, lo que no siempre es posible por que el recuento es bajo (leucopenia) o por que el volumen de la muestra no es suficiente, tiempo de realización de la prueba, procedimiento de elaboración complicado, difícil interpretación de resultados, dificultades en la estandarización, costos elevados, etc.

Así que para ayudar a un oportuno y rápido diagnóstico, se deben desarrollar nuevas metodologías que cumplan con ciertas características, algunas de ellas son: rápida elaboración, fácil interpretación, un método seguro para los operarios, reproducibles y accesibles. Que garantice la detección una concentración mínima de virus en muestras de pacientes con sospecha de infección, etc.

Puesto que el CMVH es complejo y siguiendo las reglas de la biología molecular conviene seleccionar un gen conservado. La región del gen *UL83* (pp65) forma parte de un gen de traducción tardía y transcripción temprana, por lo que fue seleccionado como blanco en este trabajo y porque es antígeno blanco de la antigenemia considerada como prueba estándar para la detección del CMVH, con lo que nos aseguramos de tener un buen gen blanco.

III. HIPÓTESIS

Será posible la detección molecular de una región del gen *UL83* (pp65) del CMVH a partir de plasma humano.

Será posible establecer las condiciones apropiadas para que el método de la PCR funcione adecuadamente y podamos de manera rápida y oportuna detectar la presencia del CMVH.

Será posible determinar con nuestra metodología el número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma detectables en muestras de pacientes con infección viral por CMVH.

IV. OBJETIVOS

1. General

Detección molecular de una región del gen *UL83* (pp65) del CMVH a partir de plasma humano.

Establecer las condiciones apropiadas del método de la PCR para detectar la presencia del CMVH de manera rápida y oportuna para el paciente.

Determinar el número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma detectables mediante el método de la PCR.

2. Particulares

1. Extracción de ADN del CMVH a partir de plasma humano.
2. Amplificación de una región de 535 pb del gen *UL83* (pp65).
3. Clonación de la región de 535 pb del CMVH.
4. Secuenciación de la clona de 535 pb del CMVH.
5. Determinación de las condiciones específicas para la amplificación de la región de 535 pb de ADN del CMVH a partir de la clona 535-CMVH.
6. Determinación del número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma mediante el método de la PCR de diseño casero.
7. Amplificación de la región de 535 pb de ADN-CMVH a partir de muestras de plasma humano negativas y positivas a CMVH.
8. Propuesta de esta técnica para monitoreo en el área clínica.

V. METODOLOGÍA

1.- OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de plasma de pacientes con sospecha de infección por CMVH por punción venosa, colectadas en tubos con anticoagulante, EDTA. Para la detección molecular en sangre, no se utilizó heparina como anticoagulante ya que es un inhibidor de la PCR. El suero y plasma se separó de la fracción celular de la sangre entre la 4a y 6a h posterior a la toma de las muestras se conservaron de 2 a 8°C durante un máximo de 7 días o congeladas a -20°C por no más de 2 meses o inferior a -70°C por más de 2 meses. El uso de las muestras humanas se hizo de acuerdo a los protocolos de bioética correspondiente.

2.- MATERIAL

ESPECÍMENES*: Se incluyeron tres tipos de muestras en el estudio.

1.- Muestras de archivo con anticuerpos IgG-CMVH e IgM-CMVH positivas. Proporcionadas por el Laboratorio de Virología de la UIMEIP-UMAE-Hospital de Pediatría-CMNSigloXXI-IMSS.

⇒ Cuatro muestras negativas a anticuerpos IgG-CMVH e IgM-CMVH.

⇒ Tres muestras positivas a anticuerpos IgG-CMVH e IgM-CMVH.

2.- Muestras con carga viral determinado con COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics), proporcionadas por la Biól, Castillo-Robles Flor- Patricia, asesora técnica producto de Grupo Roche Diagnostics.

⇒ CMVH-1 273,000 copias/ml

⇒ CMVH-2 >100,000 copias/ml

⇒ CMVH-3 15,100 copias/ml

⇒ CMVH-4 1020 copias/ml

3.- Muestras de archivo con detección del antígeno pp65 de CMVH en leucocitos (antigenemia), antígeno idóneo. Proporcionadas por el Laboratorio de Virología de la UIMEIP-UMAE-Hospital de Pediatría-CMNSigloXXI-IMSS.

*Las muestras se dividieron en alícuotas de 500 µl y almacenaron a -70 °C, hasta la extracción de ADN y la realización de la PCR. Posteriormente el ADN fue almacenado a -20 °C para el resto del análisis.

*El uso de las muestras humanas se hizo de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes.

CEPA DE REFERENCIA: Secuencia completa de la cepa AD169 número de acceso *GenBank* NC_00347.

CÉLULAS COMPETENTES: *Escherichia coli* (Top 10), cepa proporcionada por la Dra. Aguilera-Hernández Penélope del Laboratorio de Patología Vascular del Instituto Nacional de Neurología y Neuropsiquiatría-SSA.

VECTOR DE CLONACIÓN: pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega)

INICIADORES: 535 pb diseñados por la Dra. Ruiz-Tachiquín Martha-Eugenia. Sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

SENTIDO: 5'-atc gaa aaa gaa gag cgc ag-3' (20 nucleótidos, T_m = 50°C, %GC = 45, PM = 6014 g/m, DO = 5485nm, 631-650 pb)

ANTISENTIDO: 5'-aag atg cgg tag atg tcg tt-3' (20 nucleótidos, T_m = 50°C, %GC = 45, PM = 6206 g/m, DO = 4419nm, 116-135 pb)

CONTROLES PARA LA PCR: control positivo, control negativo, control interno y control no relacionado.

1. **Control positivo:** Clona CMVH-535
2. **Control negativo:** Sin ADN (1 µl de agua desionizada)
3. **Control interno:** Amplificado de 205 pb del gen β-actina (gen constitutivo)

SENTIDO: 5'-ctc aag ttg ggg gac aaa aa-3' (20 nucleótidos, T_m = 50°C, %GC = 45, PM = 6194, DO = 4137.

ANTISENTIDO: 5'atc cta cta aaa gcc acc cca ct-3' (20 nucleótidos, T_m = 52°C, %GC = 50, PM = 5975, DO = 4726.

4. **Control no relacionado:** ADN de leucocitos.

EQUIPO

- ⇒ Centrífuga con capacidad de 23,000 g.
- ⇒ Agitador térmico Eppendorf[®], modelo 22331.
- ⇒ Campana de Seguridad Biológica Grado II.
- ⇒ Campana de extracción para la preparación de la mezcla de la PCR.
- ⇒ Termociclador de gradiente (Biométra modelo: T-GRADIENT thermoblock, Alemania).
- ⇒ Analizador de imágenes SYNGENE[®] (A division of synoptics LTD). Modelo: Gene Genius, Beacon House, Nuffield Road Cambridge, CBA 1TF, UK.
- ⇒ Concentrador Eppendorf[®].
- ⇒ Vórtex.

NOTA: Se limpio la Campana de Seguridad Biológica Grado II y el material con alcohol al 70%, antes de colocarlo dentro de ella y se irradió con luz UV por 15 min. **IMPORTANTE:** en la campana de preparación de la mezcla de la PCR no se introdujo muestra clínicas (no ADN, ni ARN).

MATERIAL DESECHABLE

- ⇒ Gradillas para tubos Eppendorf
- ⇒ Tubos Eppendorf de 1.5 y 2 ml
- ⇒ Micropipetas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ l
- ⇒ Puntas con filtro de 10, 100, 200 y 1000 μ l
- ⇒ Tubos de recolección 2 ml
- ⇒ Tubos para la PCR Eppendorf de 25 μ l
- ⇒ Guantes y gasas estériles
- ⇒ Recipiente para desecho

NOTA: El material desechable se ocupo de acuerdo a los métodos. En el caso de la extracción de ADN el material que se ocupo fue de la marca QIAGEN. Dos tipos de columna QIAamp Spin Columns (purificación del producto amplificado) y QIAquick Spin Columns (purificación de la reacción de secuenciación). Todo el material utilizado libre de DNasas y en todos los procedimientos se uso estrictamente bata y guantes.

3.- PROTOCOLOS

Kit QIAamp® UltraSens™ Virus kit (QIAGEN)

3.1. Protocolo para la extracción de ADN de CMVH usando QIAamp® UltraSens™ Virus kit (QIAGEN)

1. Tomar 1 ml de plasma en un tubo Eppendorf de 2 ml, si no se completa adicionar 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos salinos (**phosphate-buffered saline**, PBS) hasta completar 1 ml.
2. Adicionar 800 µl de Buffer AC en la superficie del suero y 5.6 µl del acarreador de RNA en la tapa del tubo.
3. Cerrar el tubo Eppendorf y mezclar primero por inversión y luego con vórtex durante 10 seg.
4. Incubar 10 min a temperatura ambiente (TA).
5. Centrifugar a 9000 x g por 3 min.
6. Decantar el sobrenadante.
7. Resuspender la pastilla con 300 µl de buffer AR precalentado a 60°C.
8. Adicionar 20 µl de proteínasa K.
9. Incubar a 40°C por 10 min con agitación máxima.
10. Centrifugar brevemente.
11. Adicionar 300 µl de buffer AB, mezclar con vórtex y centrifugar brevemente.
12. Colocar una columna dentro de un tubo Eppendorf de 2 ml y adicionarle a esta 700 µl del lisado (obtenido en el paso anterior).
13. Centrifugar a 4000 x g por 1 min.
14. Retirar la columna del tubo y eliminar los residuos.
15. Colocar la columna en un tubo Eppendorf limpio de 2 ml.
16. Adicionar a la columna 500 µl de buffer AW1.
17. Centrifugar a 6000 x g por 1 min.
18. Retirar la columna del tubo y eliminar los residuos.
19. Colocar la columna en un tubo Eppendorf limpio de 2 ml.
20. Adicionar a la columna 500 µl de buffer AW2.
21. Centrifugar a 16,000 x g por 5 min.
22. Colocar la columna en un tubo limpio Eppendorf eliminando los residuos del tubo.
23. Eluir el ADN con 50 µl de agua-DEPC.
24. Incubar 5 min a TA.
25. Centrifugar a 6000 x g por 1 min.
26. Eluir nuevamente adicionando 30 µl de agua inyectable.
27. Incubar 5 min a TA.
28. Centrifugar a 6000 x g por 1 min.

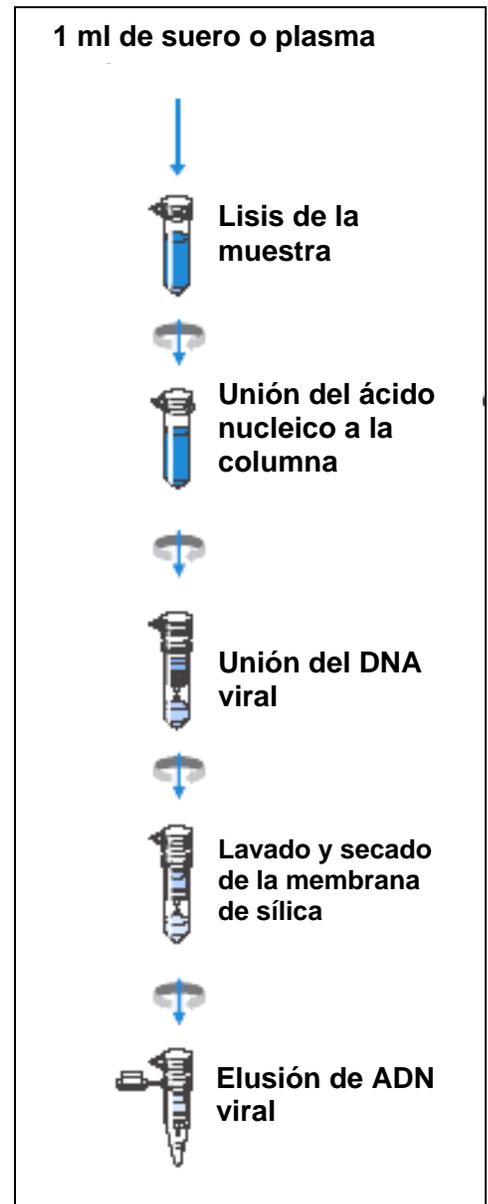


Figura 11. Diagrama del protocolo para la purificación del ADN viral. Tomada del QIAamp UltraSens Virus Handbook 01/2003, pag. 10

REACTIVOS

- ⇒ Etanol al 70%
- ⇒ Buffer AC; Buffer de lisis (contiene isopropanol)
- ⇒ Buffer AR (contiene hidrocloreto de guanidina)
- ⇒ Buffer AB (concentrado)
- ⇒ Buffer AW1 (contiene hidrocloreto de guanidina)
- ⇒ Buffer AW2 (contiene Etanol)
- ⇒ Proteinasas K
- ⇒ Acarreador de ARN
- ⇒ Agua libre de DNasas y RNasas

NOTA: Los reactivos se almacenaron a temperatura ambiente de 15 a 25 °C hasta por 12 meses, excepto la Proteinasas K que se almacena de 2 a 8°C y el acarreador ARN a -20°C, que son estables por año.

Con la siguiente fórmula se calcula la velocidad de centrifugación requerida para el procedimiento de los protocolos.

Donde:

$$g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$$

g = fuerza relativa de centrifugación
rpm = revoluciones por minuto
r = radio del rotor en centímetros

QIAquick® gel Extraction kit (QIAGEN)

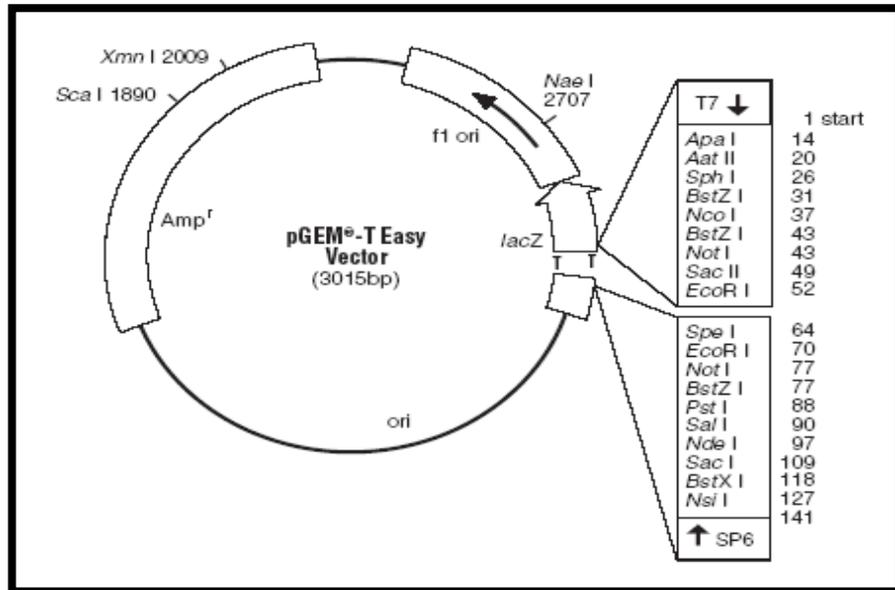
3.2. Protocolo para la purificación del producto de la PCR a partir de gel de agarosa usando el QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN)

1. Cortar la banda del gel de agarosa, pesarla y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 3 volúmenes de Buffer QG con respecto al peso del fragmento de agarosa.
3. Incubar a 56°C por 10 min con agitación constante.
4. Adicionar un volumen de isopropanol.
5. Transferir la solución a la columna con sílica gel y centrifugar a 10,000 rpm por 1 min.
6. Adicionar 500 µl Buffer QG y centrifugar a 10,000 rpm por 1 min.
7. Adicionar 750 µl de Buffer PE y centrifugar 10,000 rpm por 1 min.
8. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min para eliminar el exceso de etanol.
9. Transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
10. El producto de PCR se eluye con 50 µl de Buffer EB.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

REACTIVOS

- ⇒ Buffer QG* (contiene tiocianato de guanidina)
- ⇒ Buffer PE (concentrado, no contiene etanol, hay que agregárselo)
- ⇒ Buffer EB
- ⇒ Isopropanol

pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega)



pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

Figura 12. Mapa circular pGEM[®]-Easy Vector y los puntos de referencia de la secuencia. Tomado de: instructivo de © 2000, 2005 Promega Corporation, Printed in USA. Revised 12/05

* contiene sales caotrópicas las cuales son muy irritantes, se tomaron las medidas de seguridad apropiadas para su manejo en el laboratorio.

REACTIVOS

- ⇒ pGEM[®]-T Easy Vector
- ⇒ Control ADN inserto
- ⇒ T4 ADN ligasa
- ⇒ 2x Buffer de ligación rápida, T4 ADN ligasa

Nota: los reactivos se almacenaron a -15° ó -25°C

3.3. Protocolo para la clonación de ADN-CMVH 535 pb usando el pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega)

a) Ligación usando el Buffer de ligación rápida 2x.

1. Centrifugar brevemente pGEM[®]-T Easy Vector y colocar el control de ADN en el fondo del tubo colector.
2. Colocar la reacción de ligación en un tubo Eppendorf. Antes de usar, agitar vigorosamente el Buffer de ligación rápida 2x con vórtex. Usar 0.5 ml de ADN en los tubos.
3. Resuspender con pipeta la mezcla de reacción. Incubar la reacción por 1 h a TA. Colocar la reacción a 4°C para obtener un número máximo de transformantes.

b) Transformación con la cepa Top 10 de alta eficiencia en células competentes.

Reactivos	Estándar de reacción	Control positivo	Control de fondo
2x Buffer de ligación rápida, T4 DNA ligasa	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM [®] -T Easy Vector (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
Producto de la PCR	X µl	-----	-----
Inserto de ADN para el control	-----	2 µl	-----
Ligasa ADN T4 (3 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Agua desionizada para completar un volumen final de 10 µl	X µl	X µl	X µl

Tabla 3. Se realizo la mezcla de reactivos para la reacción y llevarse a cabo la clonación.

PRÓTCOLO PARA LA CLONACIÓN

1. Preparar el medio de cultivo en placas LB/ampicilina
2. Centrifugar la reacción de ligación brevemente. Adicionar 2 μ l de reacción de ligación a cada tubo estéril de 1.5 ml colocados previamente en hielo. Preparar un tubo de control con 0.1 ng de plásmido.
3. Colocar las células competentes cepa Top 10 de alta eficiencia en baño de hielo hasta descongelarse por 5 min. Colocar la mezcla de reacción de células en un tubo suavemente.
4. Transferir 50 μ l de células para la reacción de ligación en los tubos que se prepararon en el paso 2.
5. Usar 100 μ l de células para el tubo de control de ADN entero. Golpear suavemente los tubos e incubar por 20 min en hielo.
6. Calentar y agitar las células por 45 seg en un baño de agua a 42°C. NO AGITAR. Inmediatamente regresar los tubos al hielo por 2 min.
7. Adicionar 950 μ l del medio SOC a temperatura ambiente a la transformación de la reacción de ligación y 900 μ l al tubo de control del ADN. Incubar por 1.5 h a 37°C con agitación constante (150 rpm).
8. Colocar 100 μ l de cada transformación dentro de cada placa, por duplicado LB/ampicilina. Para el control del ADN, es recomendado una dilución 1:10 con SOC.
9. Incubar la placa 37°C. seleccionar las colonias blancas.



Figura 13. Protocolo para clonación del producto de CMVH-535. El producto de la ligación se incubó con las células competentes de la cepa Top 10 de *E coli*, para realizar la transformación, se sembraron en una placa de agar LB/ampicilina y se revisó el crecimiento. A partir de las colonias blancas se hizo la extracción de ADN. Tomado de: © 2000, 20005 Promega Corporation, Printed in USA. Revised 12/05

Big Dye Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, ABI). Secuenciador automático 3100 (ABI)

3.4. Protocolo para la secuenciación del producto clonado de CMVH-535 pb. Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems)

Molde de la PCR*

Protocolo para la purificación del fragmento de la PCR por filtración

1. Ensamblar las columnas centricon -100 siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Colocar 2 ml de agua desionizada dentro de las columnas.
3. Adicionar a la columna las muestras completas.
4. Centrifugar las columnas a 3000 x g por 10 min.
5. Remover el residuo del recipiente y agregar la recolección viral.
6. Invertir la columna y centrifugar a 270 x g por 2 min y coleccionar la muestra.
7. Debe haber entre 40 a 60 µl de muestra.
8. Adicionar agua desionizada a la columna.
9. Observar el fragmento purificado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt 0.001 mg/ml, visualizar con luz ultravioleta.

Cuantificación de ADN

Cuantificar la cantidad de ADN purificado midiendo su absorbancia a 260 nm.

Preparación de la reacción de secuenciación

Preparación de la mezcla de reacción

1. Para cada reacción, añadir los siguientes reactivos a los tubos por separado.

Reactivos	Cantidades
Mezcla de reacción de lectura	8.0 µl
Terminador	-----
Templado	50 - 100 ng
Una - cadena	200 - 500 ng
Doble - cadena	<u>30 - 90 ng</u>
ADN productos de la PCR	3.2 pmol
Iniciador** (sentido ó antisentido)	cbp
Agua Desionizada	
Volumen total	20 µl

Tabla 4. Mezcla de reactivos para la reacción de secuenciación

2. Mezclar bien y centrifugar brevemente

* Se purifico la reacción, para no presentar ninguna interferencia en la reacción de secuenciación.

** Por cada reacción de secuenciación se coloco un iniciador (sentido ó antisentido); cbp.

Ciclos de secuenciación

1. Colocar los tubos en el termociclador con un volumen final de 20 μ l.
2. Repetir el programa por 25 veces (ciclos).

<u>Programa</u>	
96°C	/ 10 seg.
50°C	/ 5 seg.
60°C	/ 4 min.

Tabla 5. Programa a seguir para llevar a cabo la reacción de secuenciación.

3. El termociclador (Biométra) cambia la temperatura 1°C por segundo.
4. Programar el termociclador a 4°C por tiempo indefinido.
5. Centrifugar el contenido del tubo en una microcentrífuga.

IMPORTANTE: Las columnas se centrifugaron de 325 a 730 x g para obtener un mejor resultado.

Purificación de la reacción de secuenciación



Purificación de reacción de secuenciación con columnas de Dye Ex (QIAGEN)

1. Resuspender suavemente la columna.
2. Aflojar la tapa de la columna.
3. Cortar la parte final de la columna en un tubo colector y centrifugar a 3000 rpm por 3 min.
4. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
5. Transferir la reacción de secuenciación a la columna.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 3 min, quitar los residuos del tubo colector.
7. Conservar el eluido, el cual contiene la reacción de secuenciación purificada.

Concentración de la reacciones de secuenciación

Las muestras se colocaron en el concentrador y se liofilizaron con vacío y calor 45°C por 20 min.

3.5. ALINEAMIENTO DE LAS REACCIONES DE SECUENCIACIÓN

Protocolo para el alineamiento de los iniciadores del producto de CMVH-535 pb con la secuencia de referencia

El alineamiento se llevó a cabo con los resultados de las dos reacciones de secuenciación (sentido y antisentido), resultados emitidos por el corrimiento electroforético en el secuenciador automático 3100 (ABI), donde el color de cada banda corresponde al dideoxinucléotido 3´ terminal de ese fragmento.

1. Los resultados de las reacciones se capturaron en el CPU.
2. Se abrió el Software *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).
3. Se eligió la función de alineamiento.
4. Se proporcionaron los datos adecuados para el alineamiento, secuencia patrón AD169 del *GenBank* con número de acceso NC_00347, las secuencias obtenidas a partir de los iniciador sentido y antisentido, y la secuencia de la clona CMVH-535 pb el programa analizo y emitió un resultado.

3.6. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE LA PCR

Para el análisis se llevó a cabo una serie de curvas experimentales donde se hicieron variaciones en las concentraciones de reactivos y temperatura de alineamiento.

Curva de MgCl ₂	Curva de iniciadores	Curva de Temperatura de alineamiento (T _m)	Curva de copias de ADN de CMVH/ml de plasma
4.5 mM	30 pmol	48°C	300,000 copias/ml
3.5 mM	20 pmol	46°C	30,000 copias/ml
2.5 mM	15 pmol	44°C	3,000 copias/ml
1.5 mM	10 pmol	42°C	300 copias/ml
1.0 mM		40°C	30 copias/m
0.5 mM			3 copias/ml

Tabla 6. Variación de reactivos y temperatura de alineamiento para estandarizar el método de la PCR.

3.6.1. Preparación de la curva estándar de 300,000 a 3 de ADN de CMVH/ml de plasma

La concentración de la alícuota inicial de ADN molde se determinó por espectrofotometría.

INICIAL = 0.22 µg/ml.

El ADN plasmídico para cada reacción de la PCR es de 5 µl.

Paso 1. Masa de una molécula de plásmido (plásmido + inserto)

$$m = [n] \left[1.096e-21 \frac{g}{bp} \right]$$

Donde:

n = tamaño del genoma (pb)

m = masa (g)

e-21 = $\times 10^{-21}$

Masa de una molécula de plásmido = $[3,550 \text{ pb}] [1.096 \text{ e-}21 \text{ g/pb}] = 3.8908 \text{ e}^{-18} \text{ g}$

$$m = 3.8908 \text{ e}^{-18} \text{ g}$$

Paso 2. Calcular la masa del plásmido.

$$[3.8908 \text{ e}^{-18} \text{ g/copias}] [300,000 \text{ copias}] = 1.1672 \text{ e}^{-12} \text{ g}$$

No.	Copias de ADN de CMVH/ml de plasma (copias/ml)	Masa de una molécula de plásmido (g)	Masa de ADN plasmídico (g)
1	300,000	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-12}
2	30,000	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-13}
3	3,000	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-14}
4	300	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-15}
5	30	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-16}
6	3	3.8908 e^{-18}	1.1672 e^{-17}

Tabla 7. Cálculos para obtener la masa del plásmido.

Paso 3. Calculo de la concentración del ADN plasmídico necesario para conseguir el numero de copias del inserto. Se divide la masa necesaria (calculada en el paso 2) entre el volumen que se pipetea en cada reacción de la PCR.

No.	Copias de ADN de CMVH/ml de plasma (copias/ml)	masa de ADN plasmídico (g)	μl por reacción de la PCR	Concentración final de ADN plasmídico (g/ μl)
1	300,000	1.1672 e^{-12}	5 μl	2.3344 e^{-13}
2	30,000	1.1672 e^{-13}	5 μl	2.3344 e^{-14}
3	3,000	1.1672 e^{-14}	5 μl	2.3344 e^{-15}
4	300	1.1672 e^{-15}	5 μl	2.3344 e^{-16}
5	30	1.1672 e^{-16}	5 μl	2.3344 e^{-17}
6	3	1.1672 e^{-17}	5 μl	2.3344 e^{-18}

Tabla 8. Concentración final del ADN plasmídico.

Paso 4. Preparación de diluciones seriadas de ADN plásmidico. Se realizaron a partir de una concentración inicial de 0.22 µg/ml.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Dilución 2.5

$$[0.22 \text{ e}^{-11} \text{ g/}\mu\text{l}] [V_1] = [2.3344 \text{ e}^{-13} \text{ g/}\mu\text{l}] [100 \mu\text{l}] \quad V_1=10 \mu\text{l}$$

Dilución 3

$$[V_1] = \frac{[2.3344 \text{ e}^{-13} \text{ g/}\mu\text{l}] [100 \mu\text{l}]}{[2 \text{ e}^{-12} \text{ g/}\mu\text{l}]} \quad V_1 = 11.672 \mu\text{l}$$

Volumen del diluyente = 100 µl – 11.672 µl = 88.328 µl (diluyente, agua estéril libre de nucleasas).

No. Dilución	Fuente de ADN plasmidico para las diluciones	Concentración inicial (g/µl) C ₁	Volumen de ADN plasmidico (µl) V ₁	Volumen del diluyente (µl)	Volumen final (µl) V ₂	Concentración final (g/µl) C ₂	No. de copias de ADN de CMVH/ml de la secuencia (5 µl)
1	Stock	0.22 e ⁻⁶	10	990	1000	0.22 e ⁻⁸	N/A
2	Dilución 1	0.22 e ⁻⁸	10	990	1000	0.22 e ⁻¹⁰	N/A
3	Dilución 2	0.22 e ⁻¹⁰	10	990	1000	0.22 e ⁻¹¹	N/A
3.5	Dilución 2.5	0.22 e ⁻¹¹	10	90	100	0.22 e ⁻¹²	N/A
4	Dilución 3	0.22 e ⁻¹²	11.6	88.3	100	2.3344 e ⁻¹³	300,000
5	Dilución 4	2.3344 e ⁻¹²	3	27	30	2.3344 e ⁻¹⁴	30,000
6	Dilución 5	2.3344 e ⁻¹³	3	27	30	2.3344 e ⁻¹⁵	3,000
7	Dilución 6	2.3344 e ⁻¹⁴	3	27	30	2.3344 e ⁻¹⁶	300
8	Dilución 7	2.3344 e ⁻¹⁵	3	27	30	2.3344 e ⁻¹⁷	30
9	Dilución 8	2.3344 e ⁻¹⁶	3	27	30	2.3344 e ⁻¹⁸	3

Tabla 9. Concentraciones y volúmenes finales para llevar a cabo la curva de 300,000 a 3 copias de ADN e CMVH/ml de plasma.

3.6.2. Programa para la estandarización

ADN molde: Para la estandarización de la PCR se utilizó como molde el producto clonado en el vector **pGEM[®] - T Easy Vector Systems (Promega)**.

Reactivos	Concentración de la solución madre	Concentración final*
H ₂ O	cbp	cbp
Buffer PCR	10 x	1 X
Mg Cl ₂	50 mM	2.5 mM
dNTP's	10 mM	0.8 mM c/u
Iniciadores:		
Sentido	4.39 pmol	20 pmol
Antisentido	4.39 pmol	20 pmol
Taq Polimerasa	5 U / μ l	2 U
ADN molde	1 μ l	1 μl
Vol. Total		30 μl

Tabla 10. Concentraciones finales para la estandarización del método de la PCR. **Nota:** las concentraciones finales de los reactivos varearon de acuerdo al experimento

3.6.3. Condiciones de amplificación para la PCR

Programa

	95 °C / 3 min
Desnaturalización	95 °C / 1 min
Alineamiento	40 °C / 1 min
Extensión	72 °C / 1 min
	72 °C / 7 min
	4 °C ----- ∞

Repetir 35 ó 40 ciclos Termociclador Biométra
--

3.7. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

La visualización de los productos amplificados, se realizó mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa entre 1.0 al 2.0% teñido con BrEt a una concentración de 0.001 mg/ml, en una cámara horizontal (Bio Rad[®], Horizon[®] 58, USA). Observándose en el transiluminador de luz ultravioleta (SYNGENE[®], USA). La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de amplificación. El producto de amplificación del gen *UL83* fue de 535 pb.

VI. RESULTADOS

1. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE CMVH-535 pb DEL GEN *UL83* (pp65)

La amplificación del fragmento del gen *UL83* (pp65) de CMVH-535 pb se realizó con el juego de iniciadores diseñados por la Dra. en C. Ruiz-Tachiquin Martha-Eugenia. La amplificación se ilustra en el gel de agarosa al 1.5% con BrEt 0.01 mg/ml (Figura 14). Las condiciones de la PCR para esta amplificación fueron, Buffer PCR 1x, dNTP's 0.8 mM c/u, MgCl₂ 2.5 mM, iniciadores (sentido y antisentido), se partió de una concentración inicial de 4.39 pmol/μl, utilizando la cantidad final de 20 pmol, Taq ADN polimerasa 2 U y 1 μg de ADN de la muestra (CV1 273,000 copias/ml), en un volumen final de 30 μl por cada reacción. El experimento se realizó con Amplificasa® (BIOGÉNICA), con T_M de 50°C con 35 ciclos. Como control negativo se utilizaron muestras IgG-CMVH e IgM-CMVH negativas y como control interno se amplificó 205 pb del gen β-actina (gen constitutivo), con una concentración inicial 25 pmol/μl utilizando solo 25 pmol con las mismas características de amplificación. En el experimento se incluyeron los dos juegos de iniciadores para una misma reacción.

En la figura 14 se amplificó el fragmento 535 pb del gen *UL83* (pp65) de CMVH y 205 pb del gen β-actina, los 535 pb amplificaron de la muestra con carga viral de 273,000 copias de ADN de CMVH/ml de plasma y las demás muestras no amplificaron la región, posiblemente debido a la baja carga viral que presentaron. La banda correspondiente al producto amplificado se cortó del gel de agarosa y se purificó con el kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN). Esta muestra fue clonada con en el vector pGEM®-T Easy Vector Systems (promega), finalmente con la clona se estandarizó el método de la PCR.

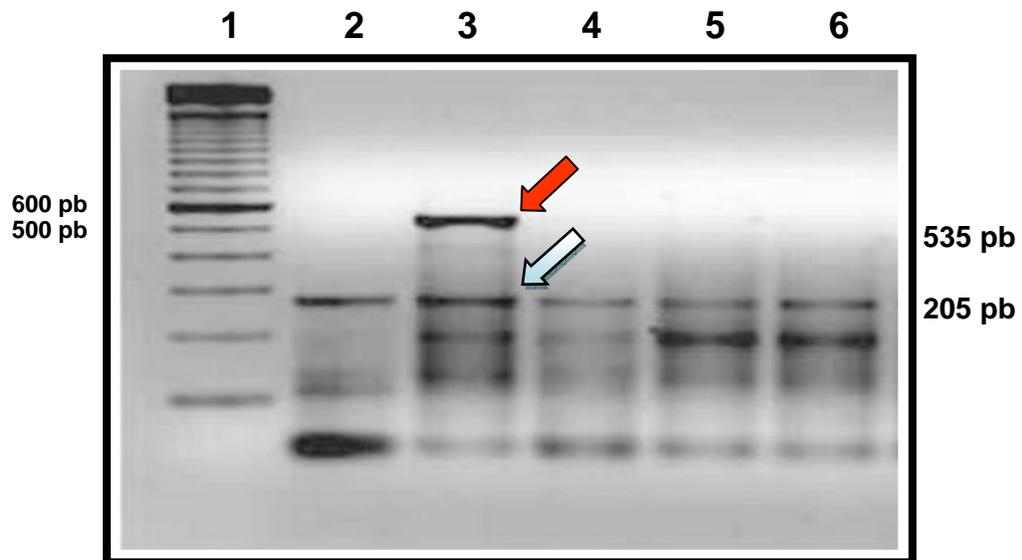


Figura 14. Amplificación de ADN-CMVH-535 pb –flecha roja-y de β actina –flecha azul-. 1) marcador 100 pb, 2) muestra IgM (+) 10 μl ADN, 3) muestra con CV1 273,000 copias de ADN del CMVH/ml, 4) muestra IgM-CMVH positivas, muestras IgG-CMVH e IgM-CMVH negativas (carriles 5 y 6). Carril 3 se observó el amplificado de CMVH-535 pb, banda intensa, debido a la cantidad de ADN del CMVH/ml amplificado.

2. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE CMVH-535 pb A PARTIR DE UNA CLONA

Se realizó el protocolo de clonación del producto purificado de ADN del CMVH-535 pb, usando células competentes de *E coli* (Top 10) con pGEM[®] T Easy Vector Systems (Promega). Se extrajo el ADN de las células y se amplificó, para verificar que se realizó correctamente la clonación. **Figura 15.**

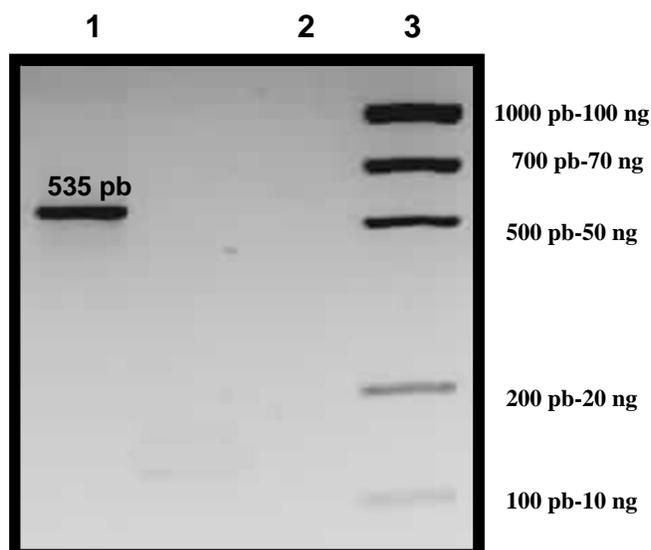


Figura 15. Amplificación de ADN de CMVH-535 pb a partir de una clona. En el gel de agarosa al 2.0% con BrEt 0.01 mg/ml. Carriles 1) producto purificado de la clona del CMVH-535 pb, 2) control negativo s/ADN, 3) marcador pb y masa (Bio Rad 2.5 µl). La concentración del producto se determinó por densitometría utilizando la herramienta del analizador de imágenes Syngene. Carril 1. Producto CMVH-535 pb con una masa de 20.66 ng.

3. PCR DE SECUENCIACIÓN

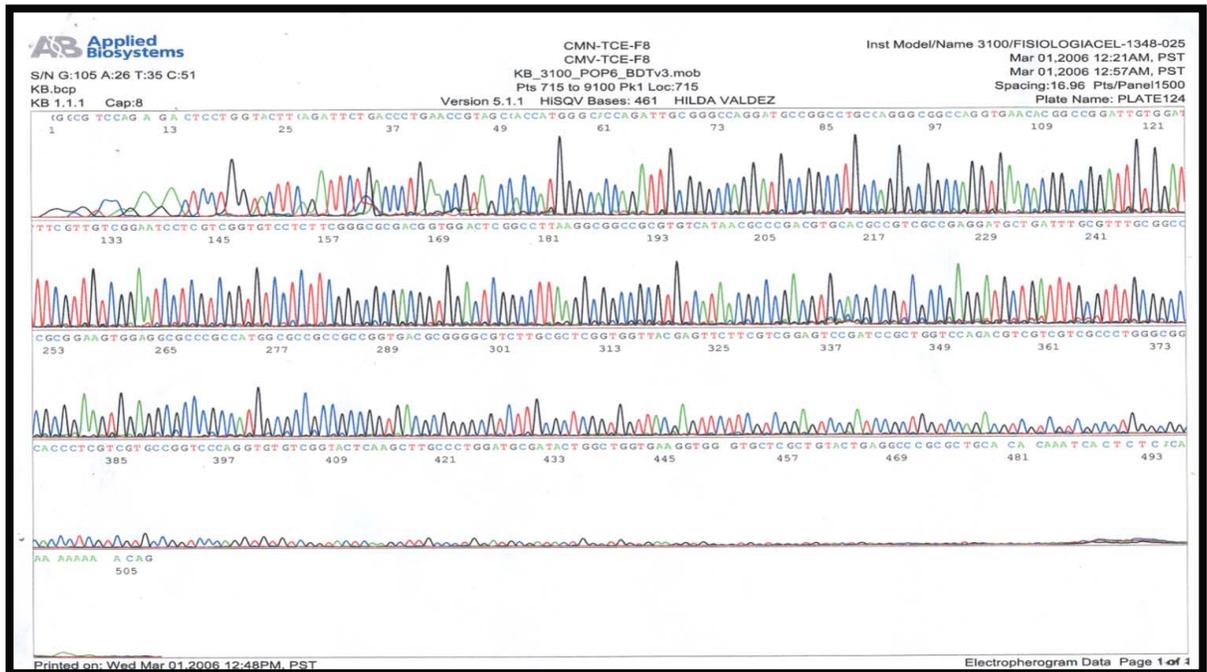
Se realizó la reacción de secuenciación utilizando Big Dye Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, ABI) y el secuenciador automático 3100 (ABI). Se colocó el iniciador sentido en una reacción y el antisentido en otra para verificar tanto la dirección 5'-3' como 3'-5'. Utilizándose 400 ng (~40 µl) de ADN plasmídico.

Para cada reacción de secuenciación se utilizaron 3.2 pmol/µl de cada iniciador y 3.0 µl de mezcla maestra (Buffer PCR 1x, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 0.8 mM, Taq Polimerasa 2 U), en un volumen final de 20 µl.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo para obtener el orden de las bases purícas y pirimidicas del producto amplificado y con ello se aseguró que fuese la región de interés. Con las secuencias obtenidas se hizo el alineamiento con la cepa patrón AD169 (*GenBank* NC_00347), mediante la herramienta de acceso gratuito en la red *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

3.1. Electroferogramas de las secuencias sentido y antisentido

A) Secuenciación sentido CMVH-535 pb



B) Secuenciación antisentido CMVH-535 pb

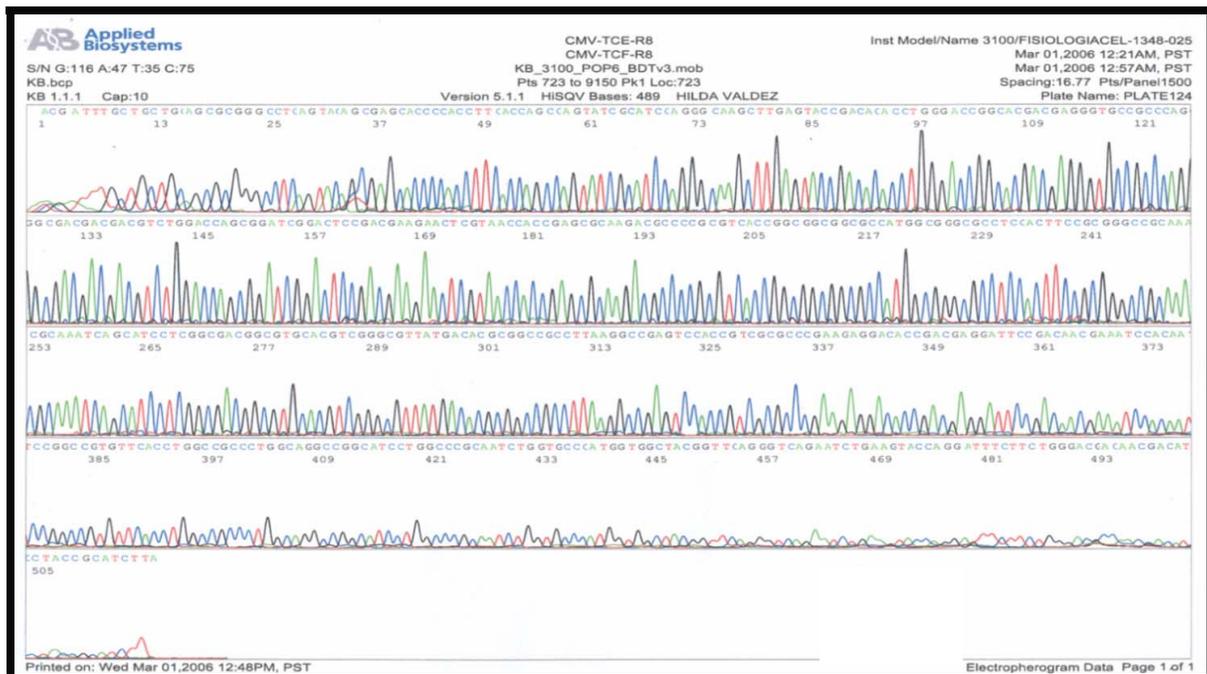


Figura 16. Secuencias obtenidas de clonas de CMVH-535 pb A) secuencia sentido. B) secuencia antisentido. [Big Dye Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, ABI). Secuenciador automático 3100 (ABI)].

3.2. ALINEAMIENTO DE LOS INICIADORES Y LA SECUENCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE LA CLONA CON LA SECUENCIA PATRÓN

	151					200
CMVDA169	TTCGGCGAAG	ATGCGGTAG.	ATGTCGTTGG	CGTCCCAGAA	GAATTCCTGG	
CMVs535GG	CGTCC...AG	AGACTCCTGG	
CMVa535TAAG	ATGCGGTAGG	ATGTCGTTGG	CGTCCCAGAA	GAACTCCTGG	
SENTIDO	
ANTISENTIDOAAG	ATGCGGTAG.	ATGTCGTT..	
Consensusaag	atgcggtag.	atgtcgtt..	
	201					250
CMVDA169	TACTTCAGAT	TCTGACCCTG	AACCGTAGCC	ACCATGGGCA	CCAGGTTGCG	
CMVs535	TACTTCAGAT	TCTGACCCTG	AACCGTAGCC	ACCATGGGCA	CCAGGTTGCG	
CMVa535	TACTTCAGAT	TCTGACCCTG	AACCGTAGCC	ACCATGGGCA	CCAGATTGCG	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	251					300
CMVDA169	GGCCAGGATG	CCGGCCTGCC	AGGGCGGCCA	GGTGAACACG	GCCGGATTGT	
CMVa535	GGCCAGGATG	CCGGCCTGCC	AGGGCGGCCA	GGTGAACACG	GCCGGATTGT	
CMVs535	GGCCAGGATG	CCGGCCTGCC	AGGGCGGCCA	GGTGAACACG	GCCGGATTGT	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	301					350
CMVDA169	GGATTTCGTT	GTCGGAATCC	TCGTGCGGTGT	CCTCTTCGGG	CGCGACGGTG	
CMVa535	GGATTTCGTT	GTCGGAATCC	TCGTGCGGTGT	CCTCTTCGGG	CGCGACGGTG	
CMVs535	GGATTTCGTT	GTCGCAATCC	TCGTGCGGTGT	CCTCTTCGGG	CGCGACGGTG	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	351					400
CMVDA169	GACTCGGCCT	TAAGGCGGCC	GCGTGTGATA	ACGCCCGACG	TGCACGCCGT	
CMVa535	GACTCGGCCT	TAAGGCGGCC	GCGTGTGATA	ACGCCCGACG	TGCACGCCGT	
CMVs535	GACTCGGCCT	TAAGGCGGCC	GCGTGTGATA	ACGCCCGACG	TGCACGCCGT	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	401					450
CMVDA169	CGCCGAGGAT	GCTGATTTGC	GTTTGCGGCC	CGCGGAAGTG	GAGGCGCCCG	
CMVa535	CGCCGAGGAT	GCTGATTTGC	GTTTGCGGCC	CGCGGAAGTG	GAGGCGCCCG	
CMVs535	CGCCGAGGAT	GCTGATTTGC	GTTTGCGGCC	CGCGGAAGTG	GAG.CGCCCG	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	451					500
CMVDA169	CCATGGCGCC	GCCGCCGGTG	A.CGCCGGGC	GTCTTGCGCT	CGGTGGTTAC	
CMVa535	CCATGGCGCC	GCCGCCGGTG	A.CGCCGGGC	GTCTTGCGCT	CGGTGGTTAC	
CMVs535	CCATGGCGCC	GCCGCCGGTG	AACGCCGGGC	GTCTTGCGCT	CGGTGGTTAC	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	501					550
CMVDA169	GAGTTCTTCG	TCGGAGTCCG	ATCCGCTGGT	CCAGACGTCG	TCGTGCGCCT	
CMVa535	GAGTTCTTCG	TCGGAGTCCG	ATCCGCTGGT	CCAGACGTCG	TCGTGCGCCT	
CMVs535	GAGTTCTTCG	TCGGAGTCCG	ATCCGCTGGT	CCAGACGTCG	TCGTGCGCCT	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	551					600
CMVDA169	GGGCGGCACC	CTCGTCGTGC	CGGTCCCAGG	TGTGTCGGTA	CTCAAGCTTG	
CMVa535	GGGCGGCACC	CTCGTCGTGC	CGGTCCCAGG	TGTGTCGGTA	CTCAAGCTTG	
CMVs535	GGGCGGCACC	CTCGTCGTGC	CGGTCCCAGG	TGTGTCGGTA	CTCAAGCTTG	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	601					650
CMVDA169	CCCTGGATGC	GATACTGGCT	GGTGAAGGTG	GGGTGCTCGC	TGTACTGAGG	
CMVa535	CCCTGGATGC	GATACTGGCT	GGTGAAGGTG	GGGTGCTCGC	TGTACTGAGG	
CMVs535	CCCTGGA.GC	GATACTGGCT	GGTGAAGGTG	GGGTGCTCGC	TGTACTGAGG	
SENTIDO	
ANTISENTIDO	
Consensus	
	651					700
CMVDA169	CCCgcgctgc	AGCAGCAAGT	CGATATCGAA	AAAGAAGAGC	GCAGCCACGG	
CMVa535	CCCgcgctgc	AGCAGCAAAT	CGATATCGAA	AAAGAAGAGC	GCAG.....	
CMVs535	CCCgcgctgc	AGCAGCAAAT	TCTTT.....	
SENTIDOATCGAA	AAAGAAGAGC	GCAG.....	
ANTISENTIDO	
Consensusatcgaa	aaagaagagc	gcag.....	

Figura 17. Alineamiento de los oligonucleótidos y fragmento amplificado de CMVAD169: cepa patrón, CMVa 535: antisentido. CMVs 535: sentido. Sentido: iniciador sentido. Antisentido: iniciador antisentido.

4. ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

Con la estandarización del método se conocieron las condiciones específicas para amplificar la región de 535 pb gen *UL83* (pp65) en muestras de pacientes con sospecha de infección por CMVH. El resultado de las condiciones de la PCR fueron: ADN plasmidico 1 μ l, Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 0.5 mM, iniciadores 5 pmol c/u (sentido y antisentido), Amplificasa[®] (BIOGÉNICA) 2.0 U y dNTP's 0.8 mM c/u. Una etapa inicial de desnaturalización de 95°C/3 min y 40 ciclos: 95°C/1 min, 40°C/1 min, 72°C/1 min, finalmente 72°C/7 min con 35 y 40 ciclos. Cada ensayo se realizó por duplicado observándose reproducibilidad en el método.

Los resultados se observaron en gel de agarosa al 1.5% con BrEt 0.01 mg/ml expuestos a luz UV en el analizador de imágenes Syngene[®].

⇒ Efecto de la concentración de $MgCl_2$

La concentración de $MgCl_2$ que presento la menor cantidad de bandas inespecíficas fue 1.0 mM por los que considero para las siguientes curvas. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron: ADN plasmidico 1 μ l, concentración final de Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 50 mM (Tabla 11.), iniciadores con una concentración inicial de 4.39 pmol/ μ l utilizando 20 pmol c/u, Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 2.0 U y dNTP's 0.8 mM en un volumen final de 30 μ l para cada muestra con 35 ciclos.

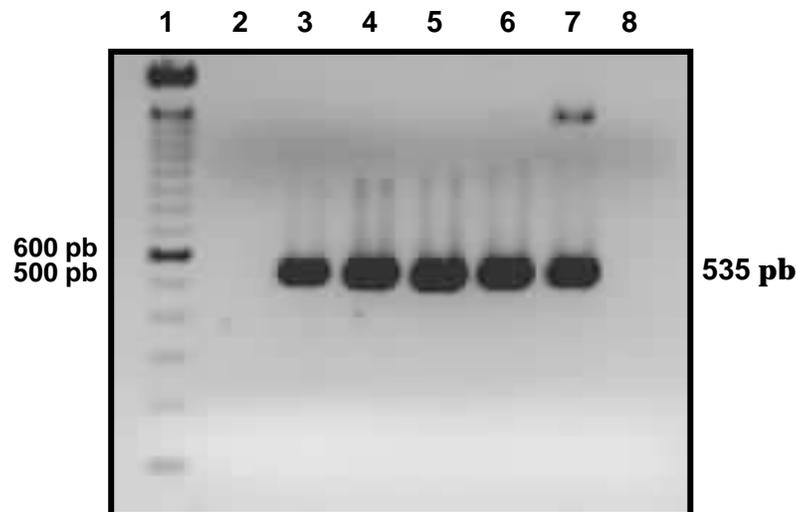


Figura 18. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ para amplificar 535 pb del gen *UL83* (pp65) de CMVH. Carriles 1) Marcador de ADN 100 pb (invitrogen), 2) 0.5 mM, 3) 1.0 mM, 4) 1.5 mM, 5) 2.5 mM, 6) 3.5 mM, 7) 4.5 mM, 8) Control negativo s/ADN (Mezcla-PCR con 1.5 mM de $MgCl_2$).

Nota: Para llegar a una concentración de 50 mM se realizó una dilución 1:5 con la que obtuvimos un volumen que se podía medir, llegando a una concentración final de 10 mM. **Tabla 11**

No. muestra	MgCl ₂ (mM)	Volumen de MgCl ₂ (μl)	Volumen de H ₂ O (μl)	Volumen final
2	0.5	1.5	12.7	14.2
3	1.0	3.0	11.2	14.2
4	1.5	4.5	9.7	14.2
5	2.5	7.5	6.7	14.2
6	3.5	10.5	3.7	14.2
7	4.5	13.5	07	14.2
(8) control negativo	1.0	3.0	11.2	14.2

Tabla 11. Volúmenes requeridos para obtener un volumen final de 10 μl de MgCl₂.

⇒ Efecto de la concentración de los iniciadores

En la curva de concentración de iniciadores no se observó diferencia entre ellas, ni bandas inespecíficas que interfieran en el método. Por lo tanto, se utilizó la menor concentración, 5.0 pmol. Las condiciones fueron: ADN plasmidico 1 μl, concentración final de Buffer PCR 1x, MgCl₂ 1.0 mM, Iniciadores 30-10 pmol c/u [(10 μl) **Tabla 12**], Amplificasa® (BIOGÉNICA) 2.0 U y dNTP's 0.8 mM en un volumen final de 30 μ para cada muestra con 35 ciclos.

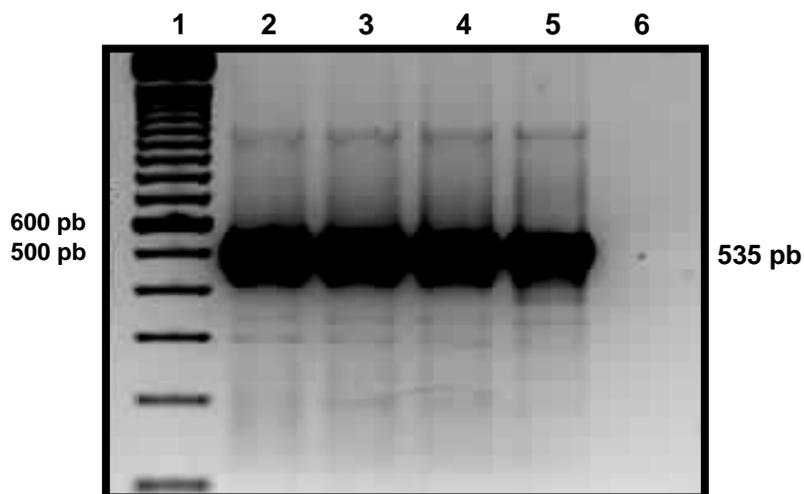


Figura 19. Efecto de la concentración de los iniciadores para la detección de ADN de CMVH-535 pb del gen UL83 (pp65). Carriles 1) marcador ADN 100 pb, 2) 30 pmol, 3) 20 pmol, 4) 15 pmol, 5) 10 pmol, 6) Control negativo s/ADN. (Mezcla de la PCR con 10 pmol de iniciadores).

Nota: La concentración inicial de los iniciadores (sentido y antisentido) fue 4.39 pmol/ μ l y se utilizó la cantidad de 30, 20, 15 y 10 pmol) utilizando 10 μ l para cada muestra ver. **Tabla 12.**

No. muestra	Iniciadores Sent y Anti (pmol)	Volumen de los iniciadores (μ l) Sent y Anti	Volumen de H ₂ O (μ l) Sent y Anti
2	30	6.8 y 6.8	3.2 y 3.2
3	20	4.5 y 4.5	5.5 y 5.5
4	15	3.4 y 3.4	6.6 y 6.6
5	10	2.3 y 2.3	7.7 y 7.7
6	Control negativo	2.3 y 2.3	7.7 y 7.7
	10		

Tabla 12. Volúmenes requeridos para obtener un volumen final de 10 μ l de los iniciadores sentido y antisentido para cada muestra.

⇒ Efecto de la Temperatura de Alineamiento (T_M)

La T_M apropiada para la amplificación de la región de 535 pb de ADN de CMVH fue la que mostro la menor cantidad de bandas inespecíficas (40°C). Las bandas inespecíficas influyen en la interpretación de resultados. A mayor T_M menor número de bandas inespecíficas amplificadas, quedando sólo la banda específica. Mismas condiciones de amplificación que el experimento anterior.

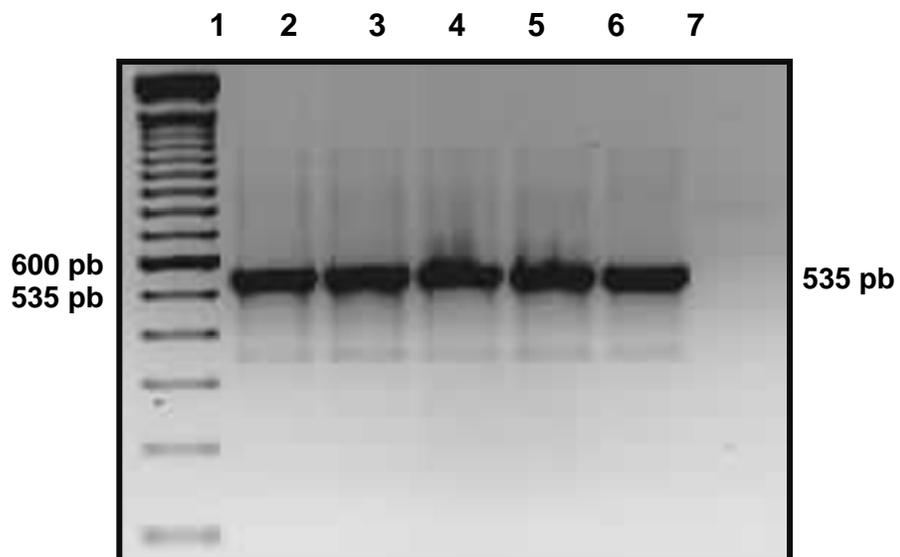


Figura 20. Efecto de la T_M en la amplificación de ADN de CMVH-535 pb del gen *UL83* (pp65). Carriles: 1) marcador de ADN 100 pb, 2) 40°C, 3) 42°C, 4) 44°C, 5) 46°C, 6) 48°C, 7) Control negativo s/ADN con una T_M de 40°C. Carril 2 observo el menor número de bandas inespecíficas. Por lo que, ésta se sugirió para los demás experimentos.

⇒ **Determinación del número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma amplificadas con 35 ciclos**

El número mínimo de copias detectadas de ADN de CMVH-535 pb con 35 ciclos fue de 3,000 como se muestra en la figura 21. Aunque, variablemente se observó hasta 300 (carril 5). Este ensayo se realizó con las condiciones ya estandarizadas (curvas $MgCl_2$, iniciadores y T_M). Una T_M 40 °C, ADN plasmidico 1 μ l, Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 1.0 mM, iniciadores 5 pmol c/u, Amplificasa® (BIOGÉNICA) 2.0 U y dNTP's 0.8 mM en un volumen final de 30 μ l por cada muestra.

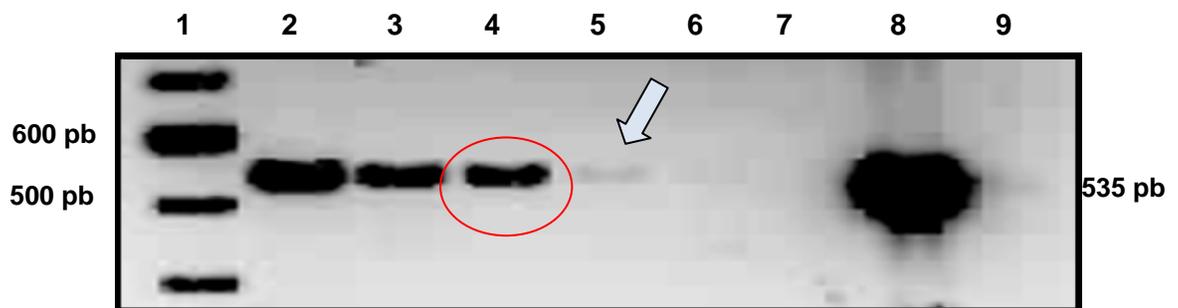


Figura 21. Número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma detectadas mediante la PCR. Carriles 1) marcadores de 100 pb, 2) 300,000 copias, 3) 30,000 copias, 4) 3,000 copias, 5) 300 copias, 6) 30 copias, 7) 3 copias de ADN de CMVH/ml, 8) control positivo, ADN de la clona CMVH-535 pb 1 μ l (dil 1:10) y 9) control negativo, sin ADN.

⇒ **Determinación del número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma amplificadas con 40 ciclos**

Aumentando a 40 ciclos se logró observar la banda correspondiente a 300 copias de ADN de CMVH/ml de plasma con mayor intensidad. Aunque esté resultado fue inconsistente. Si se incrementa el número de ciclos, se logra hacer más sensible el método, pero no es recomendable aumentar más de 45 ciclos, ya que los iniciadores tienden a unirse a lugares inespecíficos.

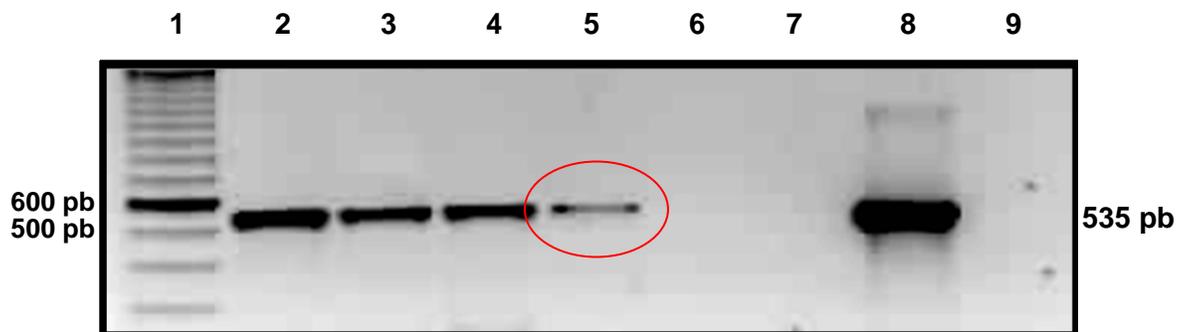


Figura 22. Número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma detectadas mediante la PCR. Carriles 1) marcadores de 100 pb, 2) 300,000 copias, 3) 30,000 copias, 4) 3,000 copias, 5) 300copias, 6) 30copias, 7) 3 copias de ADN de CMVH/ml de plasma, 8) control positivo, ADN de la clona CMVH-535 pb 1 μ l (dil 1:10) y 9) control negativo, sin ADN.

5. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE 535 pb DEL GEN *UL83* (pp65) DE CMVH PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA HUMANO

Las condiciones estandarizadas se probaron con muestras de pacientes con carga viral conocida consiguiendo amplificar la región de 535 pb de CMVH. En la figura 23 se observó la amplificación con variaciones en la intensidad de las bandas debido a la cantidad de carga viral de cada muestra. En el carril 7 se observó la banda más intensa ya que la muestra empleada presentó una carga viral de 273,000 copias de ADN de CMVH/ml de plasma. A diferencia de las otras muestras que presentaron un número menor.

Las condiciones de amplificación fueron, T_M 40°C, ADN plasmidico 10 μ l (Tabla 13), Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 0.5 mM, iniciadores 5 pmol c/u, dNTP's 0.8 mM, Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 2.0 U en un volumen final de 30 μ l para cada muestra con 40 ciclos.

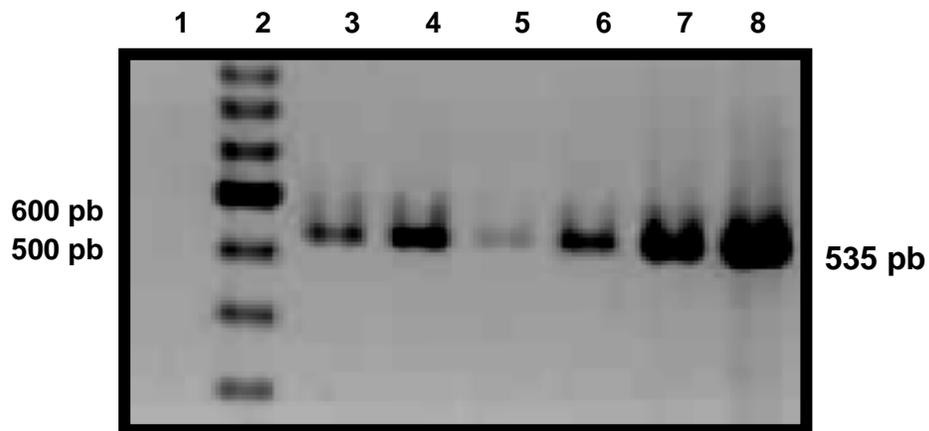


Figura 23. Amplificación de ADN de CMVH-535 pb de muestras de pacientes con estudio previo de Carga Viral. Carriles 1) Control negativo, sin ADN, 2) Marcador de ADN 100 pb (2.5 μ l), 3) 15,100 copias, 4) 273,000 copias, 5) 1020 copias, 6) >100,000 copias, 7) 273,000 copias de ADN de CMV/ml (control positivo), 8) ADN de la clona CMV-535pb, 1 μ l (dil. 1:10).

No. Muestra	Muestras (copias de ADN de CMVH/ml de plasma)	ADN (μ l)	H ₂ O (μ l)
3	15,100	4	6
4	273,000	2	8
5	1020	16	-----
6	>100,000	3	7
7	273,000 control positivo	2.5	7.5
8	ADN de la clona de CMVH-535 pb	1.0	9.0

Tabla 13. Se muestra el volumen de ADN y H₂O utilizados en la reacción de la PCR para tener un volumen final de 10 μ l.

6. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 535 pb DE CMVH EN MUESTRAS IgG-CMVH e IgM-CMVH NEGATIVAS Y CON CARGA VIRAL DETERMINADA

En la figura 24 se observó que la intensidad de la banda aumenta conforme lo hace el número de copias de ADN de CMVH/ml. En muestras negativas a IgG e IgM no se observó la amplificación de los CMVH-535 pb. El control positivo fue el amplificado de la muestra con 273,000 copias de ADN de CMVH/ml.

Las condiciones de amplificación fueron, T_M 40°C, ADN plasmidico 5 μ l (Tabla 14), Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 1.0 mM, iniciadores 5 pmol c/u, dNTP's 0.8 mM, Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 2.0 U en un volumen final de 30 μ l para cada muestra con 40 ciclos.

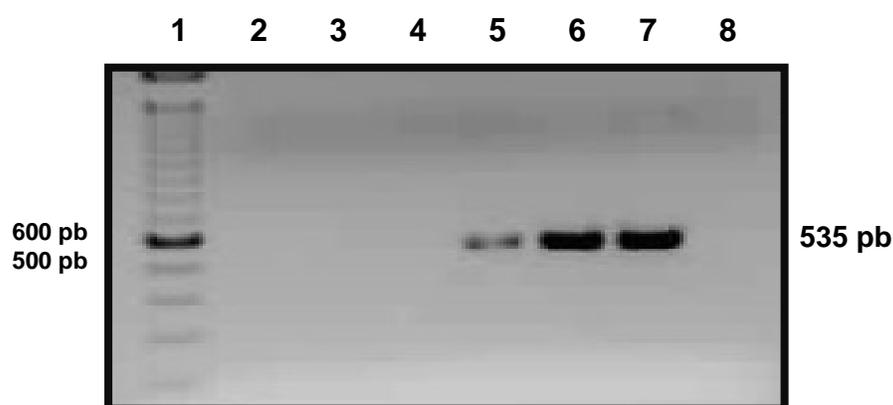


Figura 24. Amplificación de muestras con carga viral conocida y muestras IgG e IgM negativas a CMVH. Carriles 1) Marcador de 100 pb, 2) Muestra 1 IgG e IgM, 3) Muestra 2 IgG e IgM, 4) Muestra 3 IgG e IgM negativas, 5) 15,100 copias, 6) 273,000 copias, 7) >100,000 copias de ADN de CMVH/ml, 8) Control negativo, sin ADN.

No. Muestra	Muestra	Concentración de ADN ng/ μ l	ADN (μ l)	H ₂ O (μ l)
2	IgG e IgM (-)	487.5	2.0	3.0
3	IgG e IgM (-)	235	4.25	1.0
4	IgG e IgM (-)	315	3.17	1.83
5	15,100 copias CMVH/ml	330	4.0	1.0
6	273,000 copias CMVH/ml	600	2.0	3.0
7	>100,000 copias CMVH/ml	360	3.0	2.0
8	Control negativo	-----	-----	5.0

Tabla 14. Se muestra las concentraciones y volúmenes de ADN y H₂O utilizados en la reacción de la PCR para tener un volumen final de 5 μ l.

7. AMPLIFICACIÓN TESTIGO DEL GEN HUMANO β -ACTINA (GEN CONSTITUTIVO)

Como control interno de la técnica se amplificó el gen humano β -actina (gen constitutivo) para descartar que la falta de amplificación de las muestras se debiera a degradaciones de ADN o a los reactivos por sí mismo. Obteniendo como resultado la amplificación del gen en todas las muestras como se observó en la figura 25. Tomamos como parámetro esta amplificación para demostrar que las condiciones de amplificación del método funcionaron de manera adecuada. Las muestras y condiciones fueron las mismas que el experimento anterior.

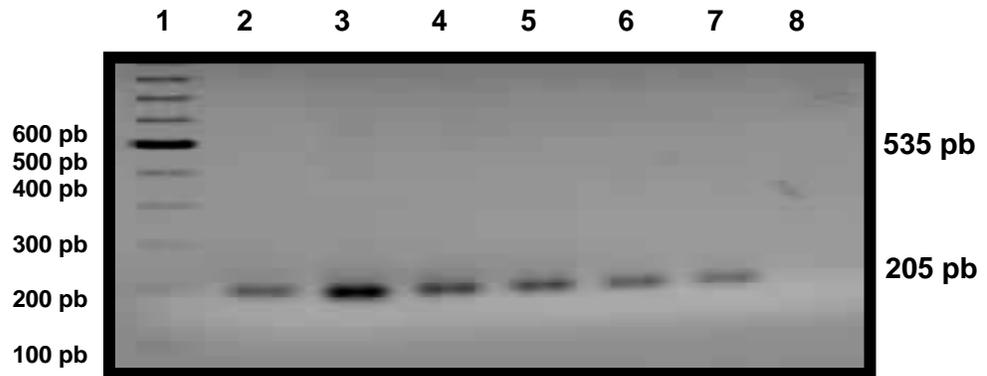


Figura 25. Amplificación del gen β -actina. Carriles 1) Marcador de 100 pb, 2) Muestra 1 IgG e IgM, 3) Muestra 2 IgG e IgM, 4) Muestra 3 IgG e IgM negativas, 5) 15,100 copias, 6) 273,000 copias, 7) >100,000 copias de ADN de CMVH/ml, 8) Control negativo, sin ADN.

8. AMPLIFICACIÓN DE ADN DEL GEN *UL83* (pp65) EN MUESTRAS POSITIVAS AL ANTÍGENO pp65

Con las condiciones ya estandarizadas se analizó muestras reportadas como positivas al antígeno pp65, de algunas de ellas se logró amplificar la region de 535 pb de CMVH, como se observo en la figura 26. En el carril 4 y 5 se observaron bandas ligeramente tenues las cuales, demuestran que el método es específico para evidenciar la presencia del gen *UL83* (pp65) en muestras con sospecha a infección por CMVH.

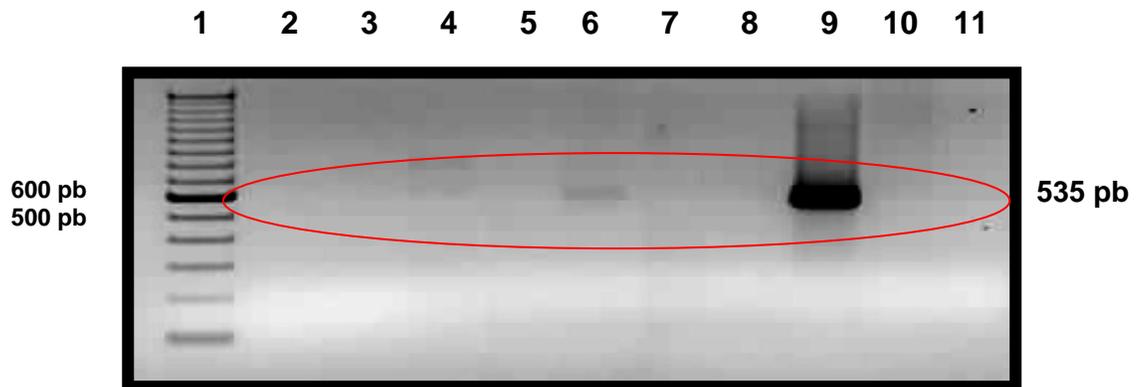


Figura 26. PCR de muestras positivas al antígeno pp65. Carriles 1) Marcador de ADN 100 pb, 2) 45 células CMV+/200,000, 3) 148 células CMV+/200,000, 4) 71 células CMV+/gota directa, 5) 254 células CMV+/200,000, 6) células CMV+ incontables, 7) 110 células CMV+/200,000 leucocitos, 8) 110 células CMV+/200,000 leucocitos, 9) Control positivo ADN de la clonaCMV-535pb (dil. 1:10), 10) Control negativo no relacionado ADN de leucocitos, 11) Control negativo, sin ADN.

En el ensayo de antigenemia el resultado es aceptable entre 10 y 250 células CMV+/preparación, más allá de este límite superior resulta extremadamente difícil realizar recuentos reproducibles y, por lo demás, tampoco es clínicamente necesario, pueden servir valores de antigenemia de 20 células CMV+/10⁵ leucocitos en los transplantados de órgano(s) sólido(s) (quizá más elevados en el trasplante cardíaco) y de 2-5 células CMV+/10⁵ leucocitos en los transplantados alogénicos de precursores hematopoyéticos.

VII. DISCUSIÓN

Debido a la amplia distribución de la infección del CMVH en la población general y a la alta incidencia de infección en personas inmunosuprimidas, ha sido nuestro interés desarrollar nuevas técnicas de detección y monitoreo rápidas, precisas, exactas, reproducibles y accesible para orientar adecuadamente el manejo de los pacientes en riesgo. La antigenemia –pp65 es una de las técnicas que revelan la presencia de infección por CMVH. Sin embargo, la interpretación del operario puede ser variable y subjetiva, proporcionando datos inexactos, difíciles de estandarizar, tiempos largos de realización de la prueba, costos elevados debido a la utilización de anticuerpos monoclonales y variaciones entre operarios y laboratorios, dificultando o imposibilitando seguimientos y estudios competitivos. En contraste, nuestro método resulto de fácil estandarización, generó resultados reproducibles y accesibles tanto técnica como económicamente. Nuestra prueba también redujo aproximadamente de 3 a 4 h el tiempo entre la preparación de la muestra y el procedimiento de la PCR en comparación con las 7 a 8 h de la prueba de antigenemia-pp65.

La técnica de antigenemia presenta dificultades particulares como es el requerimiento de un número elevado de leucocitos, y si el paciente presenta leucopenia o bien el volumen de muestra disponible no es suficiente la prueba puede fallar. También cada laboratorio debe establecer sus propios valores, a la luz de su propia experiencia, que dependerán de su procedimiento técnico, así como de las características del caso clínico particular a evaluar.

La prueba de la carga viral COBAS AMPLIOR CMV MONITOR™ Test, ensayo *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos que amplifican el ADN de CMVH. Esta técnica cuantifica dentro de un rango de 600 a 100,000 copias de ADN de CMVH/ml. Mientras que, con nuestro método, el número mínimo de copias detectables fue de 3,000 con 35 ciclos de amplificación y descendió hasta 300 copias de ADN de CMVH/ml con 40 ciclos de amplificación.

Las técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos como la PCR, han demostrado mayor eficiencia ya que amplifican directamente la región de interés, mediante el uso de iniciadores específicos y con las condiciones óptimas de amplificación. Como se ejemplificó en los experimentos anteriores.

Se partió de un grupo de muestras reportadas como IgM-CMVH positivas, IgM e IgG-CMVH negativas y una con 273,000 copias de ADN de CMVH/ml de la cual se amplificaron las regiones de 535 pb del gen *UL83* y de 205 pb del gen humano β -actina como referencia. La muestra amplificó las dos regiones, mientras que las muestras negativas solo amplifican los 205 pb del gen constitutivo de actina, lo que indicó que la PCR funcionó correctamente. Posteriormente, la banda del gel de agarosa se cortó, se purificó y secuenció, obteniéndose la secuencia de bases específica de los 535 pb de CMVH, la cual se alineó con la secuencia de referencia AD169 (*Genbank* NC-00347), con este experimento comprobamos que la región amplificada fue la objetivo.

A partir de esta clona se realizó la estandarización de la condiciones, buscando fuesen las optimas, de no ser así, principalmente los iniciadores no amplificarían la región indicadora de la presencia el virus y se presentarían falsos positivos, no dando datos exactos para el rápido diagnóstico del paciente.

Las condiciones idóneas fueron T_M 40°C, 1 µg de ADN, Buffer PCR 1x, $MgCl_2$ 1.0 mM, iniciadores 5 pmol c/u, dNTP's 0.8 mM, Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen) 2.0 U en 40 ciclos.

Con estas condiciones se realizó la curva de 300,000 a 300 copias de ADN de CMVH/ml de plasma, obteniéndose como mínimo 3,000 copias con 35 ciclos y 300 copias de ADN de CMVH/ml con 40 ciclos. Los resultados obtenidos fueron reproducidos un mínimo de tres veces

En los experimentos donde se amplificó la región de 535 pb de CMHV de muestras con carga viral conocida se observaron bandas claras, aunque variables en intensidad, posiblemente debido a las variaciones de carga viral de una muestra respecto a la otra. Todos los experimentos realizados se ratificaron, amplificando muestras IgM e IgG negativas a CMVH así como evidenciado la amplificación de la región correspondiente del gen constitutivo, β -actina.

En la figura 26, donde se analizaron muestras reportadas con antigenemia-pp65 positiva no se presentaron bandas claras al amplificar la región de CMVH-535 pb, esto posiblemente fue consecuencia de que la extracción de ADN se realizó de un volumen menor a 1 ml de plasma (menor a 500µl). Estas muestras fueron utilizadas previamente para otras pruebas sin requerimiento de material libre de DNAsas, quizás el ADN estaba parcialmente degradado en las muestras proporcionadas.

Estas podrían ser las causas y explicaciones de la débil señal en la mayoría de las carriles de la figura 26, la amplificación fue más evidente en los carriles 4 y 6, que corresponden a muestras reportadas a gota directa (carril 4) y células incontables (carril 6) en la prueba de antigenemia-pp65, lo que significa que las muestras tenían un gran número de células CMV+.

No existe una cifra única que distinga entre dar o no tratamiento a un paciente, la decisión depende del déficit inmunológico del paciente, sea por inmunodeficiencia (<100 CD_4 en pacientes con VIH) o por inmunosupresión iatrogénica (pacientes trasplantados en tratamiento) y de las condiciones clínicas. Se ha señalado que si existe un incremento de la carga viral plasmática, aumentará la posibilidad de desarrollar la enfermedad, pero no se tiene una cifra de corte hasta la fecha.

En pacientes con trasplante de órgano(s) que se están siguiendo en forma preventiva, una carga viral de 5,000 copias de ADN de CMV/ml puede ser tomada como positiva y consecutivamente iniciar un tratamiento preventivo.

Las decisiones de tratamiento se toman con base a los datos clínicos y cada vez mas también dependen de los datos del laboratorio. Por lo que el personal de apoyo se ve comprometido a ofrecer, a los médicos y pacientes, pruebas diagnósticas y de monitoreo que sean de la mayor utilidad. Y también que a los técnicos de laboratorio que las realizan, no les consuma tiempo excesivo de su jornada laboral. Las pruebas muy laboriosas son costosas, permiten atender pocos pacientes y pueden introducir muchas fuentes de error. Las pruebas ideales deberían ser tan rápidas, sencillas, reproducibles, exactas y económicas como sea posible. La metodología desarrollada representa un gran avance en estos sentidos.

VIII. CONCLUSIONES

Nuestro método de detección molecular de pp65 de CMVH es una prueba ideal para la detección temprana y de bajos niveles de CMVH en pacientes inmunosuprimidos [pacientes con SIDA o trasplante de órgano(s)], antes de la aparición de síntomas, lo que permite instaurar una terapia antes de la reactivación clínica. Además es más rápido, seguro y oportuno.

Con los resultados obtenidos en los experimentos logramos cumplir con las expectativas: la detección de la región de 535 pb del gen *UL83* (pp65) de CMVH de una muestra con carga viral conocida. La estandarización de las condiciones y la determinación del número mínimo de copias de ADN de CMVH/ml de plasma detectables con 35 y 40 ciclos y principalmente haber detectado el fragmento de 535 pb del gen *UL83* para demostrar la presencia de CMVH en muestras reportadas positivas al antígeno pp65 (antigenemia).

Nuestra prueba supera parte de los inconvenientes de una de las técnicas utilizadas como referencia para la detección de CMVH, que es la antigenemia-pp65, que también puede monitorear el tratamiento antiviral, pero que también presenta algunos inconvenientes, como sensibilidad y especificidad bajas así como respuestas falsas negativas con títulos virales bajos, etc.

IX. PERSPECTIVAS

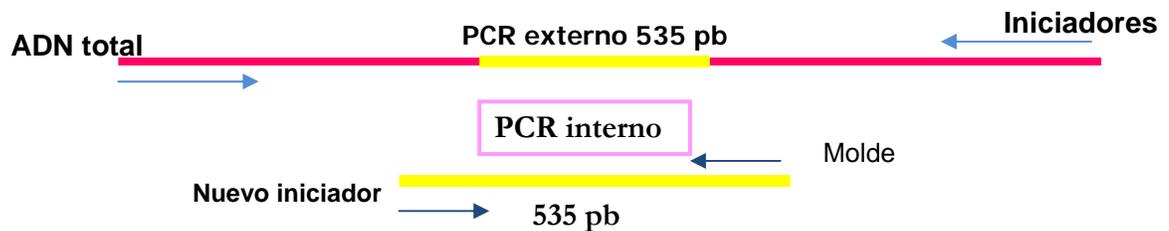
1.- Correlación de la PCR contra Antigenemia

A partir de la estandarización de las condiciones de la PCR para la detección del fragmento de 535 pb del gen *UL83* de pp65 de CMVH en plasma humano podemos hacer una correlación entre la PCR y la antigenemia para determinar la sensibilidad, precisión, exactitud y reproducibilidad que existe entre una u otra.

Hacer difusión de las características de la técnica para la detección de pp65, entre los infectólogos, médicos de transplantes y a quienes estén relacionados con pacientes inmunosuprimidos, para facilitar un diagnóstico oportuno para el paciente.

2.- PRC anidado

El realizar una PCR anidada, asociada a la PCR convencional, permitiría detectar cantidades menores de copias de ADN de CMVH por mililitro de plasma. Ya que esta técnica toma como molde el ADN resultado de la PCR convencional, con un primer iniciador, y duplica la cantidad de ADN generado gracias a un nuevo iniciador diseñado más adentro de la secuencia originalmente amplificada



X. REFERENCIAS

1. Mocarsk ES. Cytomegaloviruses and their replication. In; Fields DN, Knipe DM, Howley PM. Lippincott-Raven Publishers. Editorial. Fields Virology. 3^a ed. Philadelphia 1996, pp 2447-81.
2. Kenneth J, Ryan C, George R. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas, 4^a ed, México, D.F. Editorial. McGraw Hill; 2004, pp. 620-2
3. Baldick CJ Jr, Shenk T. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. J Virol 1996, Vol. 70, pp 6097-6105.
4. Gibson W, Protein counterparts of human and simian cytomegalovirus. Virology 1983; Vol. 128, pp 391-406.
5. Kim KS, sapienza VJ, Carp RI, Moon HM. Analysis of structural polypeptides of purified human cytomegalovirus. J Virol 1976 Vol. 20, pp 604-611.
6. Stinski MF. Human cytomegalovirus: Glycoproteins associated with virions and dense bodies. J Virol 1976 Vol. 19, pp 594-609.
7. S.M. Varnum, D.N. Streblow, M.E. Monroe, P. Smith, K.J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D.G. 2nd Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R.D. Smith, J.A. Nelson, "Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome", J. Virol., 2004, Vol. 78, 20, pp. 10960-10966.
8. Chee MS, Satchwell SC, Preddi E, et al. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. Nature 1990, Vol. 344, pp 774-777.
9. Gibson W, Protein counterparts of human and simian cytomegalovirus Virology 1983; Vol. 128, pp 391-406.
10. Gibson W, Banxter MK, Clopper KS. Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46. J Virol 1996, Vol. 70, pp 7454-7461.
11. Gibson W, Marcy AI, Comolli JC, lee J. Identification of precursor to cytomegalovirus capsid assembly protein and evidence that processing result in loss of its carboxy-terminal end. J Virol 1990, Vol. 6, pp 1241-1249.
12. Trus BL, Gibson W, Cheng N, Steven AC. Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: Evidence for tegument attachment sites. J Virol 1999, Vol. 73, pp 2181-2192.
13. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. Intervirology 1996, Vol. 39, pp 401-412.
14. Spaete RR, Mocarski ES. The a sequence of the cytomegalovirus genome functions as a cleavage /packaging signal for herpes simplex virus defections genomes. J Virol 1985, Vol. 54, pp 817-824.
15. Cranage MP, Kouzarides T, Bankier AT, et al. Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. EMBO J 1998 Vol. 6, 5, pp 3057-3063.
16. Pereira L, Hoffman M, Tatsuno M, Dondero D. Polymorphism of human cytomegalovirus glycoprotein characterized by monoclonal antibodies. J Virol 1997, Vol. 139, pp 73-86.
17. Spaete RR, Thayer RM, Probert WS, et al. Human cytomegalovirus strain Town glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. Virology 1988, Vol. 167, pp 207-225.

18. Huber MT, Compton T. The Human cytomegalovirus UL74 genes encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L- containing envelope complex. *J Virol* 1998, Vol. 72, pp 8191-8197.
19. Spaete RR, Perot K, Scott PI, et al. Coexpression of truncated human cytomegalovirus gH with the UL115 gene product or truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gH to the cell surface. *Virology* 1993, Vol. 193, pp 853-861.
20. Butcher SJ, Aitken J, Mitchell J, et al. Structure of their human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct Biol* 1998, Vol. 124, pp70-76.
21. Thomsen DR, Roof LL, Homa FL. Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. *J Virol* 1994, Vol. 68, pp 2442-2457.
22. Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996, Vol. 39(5-6), pp 389-400
23. Wich AR, Woods AS, McNally LM, et al. A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: Identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, Vol. 88, pp 10792-10796.
24. Mocarski ES. Cytomegalovirus biology and replication. In: Roizman B, Whitley R, Lopes C, eds. *The human Herpesviruses*. New York: Raven Press, 1993, pp 173-226.
25. Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K. Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B- mediated cell-cell fusion. *J Gen virol* 1996, Vol. 77, pp 2297-2302.
26. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993, Vol. 193, pp 834-841.
27. Navarro D, Paz P, Tugizov S, et al. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell and fusion of infected cells. *Virology* 1993, Vol. 197, pp 143-158.
28. Pietropaolo R, Compton T. Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J Gen Virol* 1999, Vol. 80 pp 1807-1816.
29. Tugizov S, Maidji E, Pereira L. Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells. *J Gen Virol* 1996, Vol. 77, pp 61-74.
30. Tugizov S, Maidji E, Xiao J, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein B contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cell. *J Virol* 1998, Vol. 72, pp 7374-7386.
31. Tugizov S, Navarro D, Paz P, et al. Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: Syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies. *Virology* 1994, Vol. 201 pp 263-276.
32. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. Accumulation of virus tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: Characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 2000, Vol. 74, pp 975-986.
33. Alder Sp, Plotkin SA, Gonczol E, et al. A canarypox vector expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primers for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne). *J Infect Dis* 1999, Vol. 180, pp 843-846.
34. Pass RF, Dulieg AM, Boppana S, et al. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvan. *J Infect Dis* 1999, Vol. 180, pp 970-975.

35. Chou SW, Dennison KM. Analysis of inter strain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization related epitopes. *J Infect Dis* 1991, Vol. 163, pp 1229-1234.
36. Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoproteins genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Virol* 1994, Vol 169, pp 769-774.
37. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6 : Structure, coding content, and genome evolution. *Virology* 1995, Vol. 209, pp 29-51.
38. Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. *J Virol* 1996, Vol. 70, pp 5975-5989.
39. Rawlison WD, Farrell HE, Barrel BG, Analysis of complete DNA Sequence of murine cytomegalovirus *J Virol* 1996, Vol. 70, pp 8833-8849.
40. Vink C, Beuken E, Bruggeman C. The complete DNA sequence of the genome of rat cytomegalovirus. *J Virol* 2000, Vol. 74, pp 7656-7665.
41. Roby C, Gibson W. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human citomegalovirus. *J Virol* 1986, Vol. 59, pp 714-727.
42. Somogyi T, Michelson S, Masse MJ. Genomic location of human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). *Virology* 1990, Vol. 174, pp 276-285.
43. Jahn G, Kouzarides T, Mach M, et al. Map position and nucleotide sequence on the gene for the large structural posphoprotein of human cytomegalovirus. *J Virol* 1987, Vol.61, pp 3309-3318.
44. Benko DM, Haltiwanger RS, Hart GW, Gibson W: Virion basic phosphoprotein from human cytomegalovirus contain O-linked N-acetylglucosamine *Proc Natal Acad Sci U S A* 1988, Vol. 85, pp 2573-2577.
45. Landini MP. Antibodies to human cytomegalovirus structural polypeptides. *Rev Med Virol* 1992, Vol 2, pp 63-72.
46. Rapalti A, Ruan Q, Boccuni MC, et al. Construction of polyepitope fusion antigens of human cytomegalovirus ppUL32 : Reactivity with human antibodies. *J Clin Microbiol* 1994, Vol. 32, pp358-363
47. Liu B, Stinski MF. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promotor with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 1992; Vol. 66, pp 4434-44.
48. Winkler M, Stamminger T. A specific subform of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69, is contained within the tegument of virus particles. *J Virol* 1996, Vol. 70, pp 8984-8987
49. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (8^a ed). Washington: ASM Press 2003, pp 1304-1318.
50. Fortunato EA & Spector DH. Regulation of Human Cytomegalovirus Gene Expression. *Advances in Virus Research* 1999, Vol 54, pp 61-128.
51. Irmiere, A., and W. Gibson. 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130:118–133.

52. Revello, M. G., E. Percivalle, A. Di Matteo, F. Morini, and G. Gerna. 1992. Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J. Gen. Virol.* 73:437–442.
53. Beninga, J., B. Kropff, and M. Mach. 1995. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* 76:153–160.
54. Grefte, J. M., B. T. van der Gun, S. Schmolke, M. van der Giessen, W. J. van Son, B. Plachter, G. Jahn, and T. H. The. 1992. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* 73: 2923–2932.
55. Schmolke, S., H. F. Kern, P. Drescher, G. Jahn, and B. Plachter. 1995. The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. Virol.* 69:5959–5968.
56. Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6:515–523.
57. Gandhi M, Khanna R. Human cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004, Vol.4, pp 725-38.
58. Anónimo. Comparison and availability of diagnostic assays for cytomegalovirus detection in transplant recipients. En: Griffiths PD, Whitley RJ (eds). *The challenge of CMV infection and disease in transplantation. Recommendations from the IHMF Management Strategies Workshop and the 8th Annual Meeting of the IHMF.* <http://www.ihmf.org/> (acceso electrónico, 15 de octubre de 2004).
59. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1998, Vol. 11, pp 533-534.
60. Baldanti F, Gerna G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs: diagnosis, monitoring and clinical impact. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:324-330.
61. Hirsch SM. Infección por citomegalovirus. En Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. *Principios de medicina interna de Harrison.* 13ª ed. Editorial. Interamericana Mc-Graw-Hill de España; 1994, Vol. 146, pp 922-6.
62. Griffiths P. Zuckerman A., Benalvale J. & Pattison J. (eds.) John Willey and Sons Ltd. England. *Cytomegalovirus.* En: *Principles and practice of clinical virology.* 3ª ed., 1994, pp. 69-108.
63. Muñoz Cruz, D., E. Vazquez Meraz, E. Jiménez Hernández et al. Falla de filtros para leucocitos para prevenir infección por citomegalovirus en un paciente con trasplante de médula ósea. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2001 Vol.58, No.5 1665-1146.
64. Valls Sánchez de Puerta, E. Seguimiento de recién nacidos de riesgo infeccioso. *Vox Paediatrica,* 2000 Vol. 8, 2 pp 21-26.
65. Taylor G. H. Cytomegalovirus. *American Family Physician* 2003, Vol. 67 (3), pp 519-524.
66. Gandhi M, Khanna R. Human cytomegalovirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004, Vol.4, pp 725-38.
67. Ramsay AJ, Ruby J, Ramshaw IA. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol Today* 1993, Vol. 14, pp 155-7.
68. Pomeroy C, DeLong D, Clabots C, Riciputi P, Filice GA. Role of interferon-gamma in murine cytomegalovirus infection. *J Lab Clin Med* 1998, Vol. 132, pp 124-33.

69. Sandoval C, C. Infecciones Intrauterinas. En: Temas Selectos en Pediatría. Segunda Edición. Bucaramanga. UIS 2005, pp 79-102.
70. Epidemiologia Stagno S, Brito W. Cytomegalovirus Infections. En: Remington J, Klein J. Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 6ª ed., ELSEVIER saunders. 2006, pp 739-782.
71. Stanno S, Pass RF, Altord CA, Perinatal infections and maldevelopment, Birth Defects 1981, Vol. 17, pp 31 -50.
72. Mazzull T., Rubin R. & Ferraro M. et al.: Cytomegalovirus antigenemia: Clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. J. Clin. Microbiol 1993, Vol. 31, pp 2824.
73. Grossi P, Minoli L, Percivalle E et al. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. Transplantation 1995, Vol. 59, pp 847-851.
74. Kalpoe JS, Kroes CM, de Jong MD et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of criteria by analysis of correlation to antigen detection. J Clin Microbiol 2004, Vol. 42, pp 1498-1504.
75. Pérez Sáenz JL, Erice Calvo-Sotelo A. Infecciones causadas por citomegalovirus. En: Rozman C. Farreras-Rozman. Medicina Interna, 15ª ed, Madrid: Elsevier, 2004, pp 2467-2471.
76. Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. Transplantation 2004, Vol. 77, pp 1692-1698.
77. Application of molecular Biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. Frontiers of Bioscience 1996, pp 72-77.
78. Niubò J, Pérez JL, Martínez-Lacasa JT et al. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1996, Vol. 24, pp 19-24.
79. Pérez JL, Salvà J, Niubò J. La prueba de antigenemia para citomegalovirus. Enferm Infecc Microbiol Clin 1994, Vol. 12, pp 251-269.
80. Balfour HH, Heussner RC. Cytomegalovirus: silent cause of birth defects En: Herpes Diseases and your health. Minneapolis: University of Minnesota 1985, pp 120-37.
81. Biron ChA, Cousens LP, Ruzek MC, Su HC, Salazar- Mather TP. Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping endogenous cellular immunity. En Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation VII Plenum Press, New York 1998, Vol. 15, pp 143-9.
82. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1998, Vol. 11, pp 533-534.
83. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. Clin Microbiol Rev 1999, Vol. 12, pp 286-297.
84. Practical Molecular Biology (2003): PCR Optimization. <http://www.molbiol.ru/eng/>.
85. Promega Technical Bulletin (2005): PCR Core Systems. Instructions for use of products M7660 and M7665. www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html.
86. Barbeyrac, B., Bébéar, C. y Taylor Robinson, D. (1996): PCR: Preparation of DNA from clinical Specimens. En: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma. Vol.II. Diagnostic Procedures. Academic Press, Inc., San Diego, California. pp: 61-65.

87. Lozada, Margarita (2002): Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa. Monografias.com.
88. Binder, A. (1997g) Standard PCR Conditions. <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node32.html#SECTION00561000000000000000>
89. Henegariu, O. (2000g): Primer amount in PCR <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>
90. Brinkmann Instruments (2004): PCR optimization. <http://www.brinkmann.com/utilities/404.asp>
91. Binder, A. (1997c) : PCR Techniques <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node31.html>
92. Henegariu, O. (2000c): Choosing/designing PCR primers. <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>
93. Brinkmann Instruments (2004): PCR optimization. <http://www.brinkmann.com/utilities/404.asp>
94. Henegariu, O. (2000e): Nucleotid (dNTP) <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/p13.html>.
95. Eckert, K.A. y Kunkel, T.A. (1990): High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 18, 3739-44.
96. Binder, A. (1997a): The PCR Buffer. <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node35.html>.
97. Henegariu, O. (2000f): PCR buffers <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>
98. Rees, W. A.; Yager, T. D.; Korte, J. y Von Hippel, P.H.(1993): Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting. *Biochemistry* 32: 137-144.
99. Henegariu, O. (2000a): Designing PCR programs. <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/>.
100. Promega Protocols and Applications Guide (2005): Nucleic Acid Amplification. Chapter 1. www.promega.com/paguide/.
101. Binder, A. (1997f): Used Materials and Precautions. <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node38.html#SECTION00567000000000000000>.
102. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2004): Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Office International Des. Epizooties, Chapter 1.1.4. pp: 1-10.
103. Farmacopea Europea 5.8 (2007): Mycoplasmas. Appendix 2.6.7
104. Universidad de valencia, Guía para la secuenciación automática de DNA. SERVICIO CENTRAL DE SOPORTE A LA INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL-S.C.S.I.E.
105. Bohinski, R. Bioquímica. 5ª ed., Ed. Addison-Wesley Longman, México DF 1991, pp 245-246, 277-281.
106. Greene, J. V. Rao. Recombinant DNA Principles and Methodologies. *Biotechnology Advances* 1999, Vol. 17, pp 385-386.
107. Griffiths A., Miller J., Suzuki., Lewontin R. W. Gelbart. 1998. Genética. 5ª ed, 2ª reimpression, Ed. McGraw-Hill. Interamericana, Madrid, pp 429-452, 456-479.
108. Klug, W. M. Cummings. Conceptos de Genética. 5ª ed., Ed. Prentice Hall, Madrid 1999, pp 453-515.
109. Reina, M. Técnicas de introducción de moléculas en las células. Universidad de Barcelona, Departamento de Biología Celular 2000 <http://bio.ub.es/biocel/ pbc/sub/transfeccion.htm>

110. Silva, M. Hospederos para clonaje molecular, Universidad de Évora, Portugal 1999, <http://www.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Hospedeiros/Hospedeiros.htm>
111. Madigan M., Martinko J. J. Parker. Brock: Biología de los microorganismos. 8ª ed., Editorial. Prentice Hall, Madrid 1999, pp 357–395.
112. Stryer, L. Bioquímica tomos I y II. 4ª ed, Editorial. Reverté, Barcelona 1995, pp 120–121, 792, 859.
113. Smith, C. E. Wood. Biología molecular y biotecnología. Editorial Addison–Wesley Iberoamericana, EUA 1998, pp 185–211.
114. CUMMINGS, R. M. Herencia humana: principios y conceptos. Editorial McGraw–Hill Interamericana, España 1995, pp 96–97.
115. Chen, S. D. Wilson. Construction and Characterization of Escherichia coli Genetically Engineered for Bioremediation of Hg²⁺–Contaminated Environments. Applied and Environmental Microbiology, June 1997, pp 2442–2445.
116. Cherrington JM, Mocarki ES. Human cytomegalovirus *ie1* transactivates the α promoter. enhancer via an 18-base-pair repeat element. J virol 1989; Vol. 63, pp 1435-1440

XI. ANEXOS

ANEXO 1.

Composición de los marcos abiertos de lectura (*ORF*'s) del genoma de CMVH, proteínas y características.

Nombre del gen	Tamaño (K-AUG)	Familia del gen	Producto del gen	Características de las proteínas	
				HC	Comentarios (referencias)
J1L	= 309			-	Regions in common with J1L and J1S
TRL1	311 +			-	Identical to IRL1
TRL2	115			-	Identical to IRL2
TRL3	114 +			-	gp? Identical to IRL3
TRL4	← 170		β _{2,7} transcript	-	(Δ*) Identical to IRL4 (38,191,513,516)
TRL5	114 +			-	(Δ*) Identical to IRL5
TRL6	← 111 +			-	(Δ*) Identical to IRL6
TRL7	← 82 +		β _{1,2} transcript	-	(Δ*) Identical to IRL7
TRL8	129 +			-	(Δ*) Identical to IRL8
TRL9	143			-	(Δ*) Identical to IRL9
TRL10	171 +			-	(Δ*) Identical to IRL10
TRL11	234 +	RL11		-	(Δ*) gp? Identical to IRL11
TRL12	416 +	RL11		-	(Δ*) gp? Identical to IRL12 (547)
TRL13	147 +			-	(Δ*) gp? Identical to IRL13 (547)
TRL14	186 +	RL11		-	(Δ*) gp? N-terminal 35 codons identical to IRL14 (547)
UL1	224 +	RL11		-	(Δ) gp? (455,547)
UL2	← 60 +			-	(Δ) gp? (455,547)
UL3	← 105 +			-	(Δ) (455,547)
UL4	152 +	RL11	48 kd, gpUL4	-	(Δ) (17,86,221,455,547)
UL5	166 +	RL11		-	(Δ) gp? (455,547)
UL6	284 +	RL11		-	(Δ) gp? (455,547)
UL7	222 +	RL11		-	(Δ) gp? (455,547)
UL8	122 +	RL11		-	(Δ) gp? (547)
UL9	228 +	RL11		-	(Δ) gp? (547)
UL10	326	RL11		-	(Δ) gp? (547)
UL11	275 +	RL11		-	gp?
UL12	← 73 +			-	gp?
UL13	473 +			-	gp?
UL14	343 +			-	gp?
UL15	← 322			-	
UL16	230 +		gpUL16	-	(Δ) (252)
UL17	104 +			-	
UL18	368 +		gpUL18	-	(Δ) Similar to MHC class I (32,71,89,116,150,318)
UL19	98 +			-	
UL20	340 +			-	(Δ) gp? Similar to T cell receptor γ (31)
UL21	← 175 +			-	
UL22	← 128			-	Highly hydrophobic
UL23	← 342	US22		-	
UL24	← 358 +	US22		-	
UL25	656 +	UL25	virion?	-	(M) (26,636)
UL26	← 188 +		virion?	-	(M) (26)
UL27	← 608 +			-	
UL28	← 379	US22		-	
UL29	← 360 +	US22		-	
UL30	← 121 +			-	
UL31	694			-	
UL32	← 1048 +		pp150, ppUL32	-	(M) (214,234,473)
UL33	390 +	7TM	gpUL33	-	(Δ, E) Similarity to GCR (49,94,347)
UL34	504			-	
UL35	640 +	UL25		-	
UL36	← 476 +	US22	pUL36 ^{ICA}	-	(Δ, A, M?) Spliced (186,417,554)
UL37	← 487 +		gpUL37	-	(Δ, A) Spliced exons 1, 2, & 3 (185,554)
UL37x1	← 163 +		UL37x1, vMIA	-	(A) (185,554)
UL38	← 331 +			-	
UL39	124			-	

Continúa

Nombre del gen	Tamaño del gen	Familia del Gen	Producto del gen	HC	Características de las proteínas
					Comentarios (referencias)
UL40	← 221 +		gpUL40	-	(561)
UL41	← 141			-	
UL42	← 125 +			-	(Δ) gp? (124,386)
UL43	← 423 +	US22		-	(Δ) (124,386)
UL44	← 433 +		ICP36, p52, ppUL44	+	(D) DNA pol processivity factor (20,312,412,591)
UL45	← 906		RR1	+	(D?)
UL46	← 290 +		mC-BP	+	(C) (177)
UL47	982 +		HMW-bp, ppUL47	+	(M, P) (26,227)
UL48	2241 +		HMWP, ppUL48	+	(M, P) (63,227)
UL48.5	75 +		SCP	+	(C) UL48/49 (26,75, 178)
UL49	← 570 +		virion?	+	(M?)
UL50	← 397 +		virion?	+	gp? (M?)
UL51	← 157 +		virion?	+	(M, P?)
UL52	668 +		virion?	+	(M, P?)
UL53	376 +		virion?	+	(M?)
UL54	← 1242 +		DNA Pol	+	(Δ) (20,24,106,261,287,412,495)
UL55	← 906 +		gB	+	(E) Major envelope (66,118,515)
UL56	← 850 +		pUL56	+	gp? (M, P) (50,51,63,290)
UL57	← 1235 +		ppUL57, ICP8, ssDNA BP	+	(Δ) (18,20,259,412,419)
oriLyt					
UL58	124			-	
UL59	← 123 +			-	
UL60	← 160			-	
UL61	← 431			-	
UL62	← 217			-	
UL63	129			-	
UL64	← 100			-	
UL65	102			-	
UL66	← 114		pp67, ppUL65?	-	(M?) (125)
UL67	← 113 +			-	gp?
UL68	← 110 +			-	
UL69	← 744 +		ppUL69	+	(Δc, M, T) (204,328,608,610)
UL70	← 1062		Helicase-primase	+	(D) (20,412,496)
UL71	411			+	
UL72	← 388 +		dUTPase	+	(D)
UL73	138 +		gN?	-	(E?) gp? homolog of EBV gN (301)
UL74	← 466 +		gO	+	(E) complexed with gH/gL (224)
UL75	← 743 +		gH	+	(E) complexed with gL/gO (119, 253,411)
UL76	325 +		virion?	+	(M?)
UL77	642 +		virion?	+	(M, P?) Pyruvyl decarboxylase? (625)
UL78	431 +	7TM		+	Similar to GCR (188)
UL79	← 295 +			+	
UL80	← 708 +		Assemblin precursor	+	Maturational protease (30,176,179,612)
UL80.5	← 373 +		AP precursor	+	Scaffolding protein (176,179,457, 594,612)
UL81	← 116			-	
UL82	← 559	UL82	pp71, UM, ppUL82	-	(Δc, M, T) (323,467) (Greaves, pers. comm.)
UL83	← 561 +	UL82	pp65, LM, ppUL83	-	(Δ, M) bound to cell kinase (406,481)
UL84	← 586 +		ppUL84	-	(D) (169,207,412,476,519)
UL85	← 306 +		mCP	+	(C) (26,177)
UL86	← 1370 +		MCP	+	(40,91,95,612)
UL87	941 +		virion?	+	(M?)
UL88	429 +		virion	-	(M) (26)
UL89	← 674 +		virion	+	(M, P) Spliced, exon 1 between UL94/UL95 (290,571)
UL90	66 +			-	

Continúa

Nombre del gen	Tamaño del gen	Familia del gen	Producto del gen	HC	Características de las proteínas
					Comentarios (referencias)
UL91	111 +			-	
UL92	201 +			-	
UL93	594 +		virion?	+	(M?) (605)
UL94	345 +		virion?	+	(M?) (605-607)
UL95	531 +		virion?	+	(M?) (605)
UL96	115 +		virion?	+	(M?) (605)
UL97	707 +		ppUL97	+	(Δc, M) kinase ganciclovir (93,321,439,548,611)
UL98	584 +		DNase	+	(M?) (2,165)
UL99	190 +		pp28	+	(M) (2,369,474)
UL100	← 372 +		gM	+	(E) Multiply hydrophobic complex with gN (250,317)
UL101	115			+	(497)
UL102	873		Helicase-primase	+	(D) (20,412,497)
UL103	← 249 +			+	
UL104	← 697 +		virion?	+	(M, P?) (Rubsamen-Waigmann, pers. comm.)
UL105	956 +		Helicase-primase	+	(D) (20,412,496)
UL106	← 125 +			-	
UL107	← 150			-	
UL108	123			-	
UL109	← 98 +			-	
UL110	← 127			-	
UL111	← 107			-	
UL111A	78 +			-	Transforming region (139)
UL111.5A	175 +		cmvIL-10	-	UL111A + exons 2 & 3 (284,326)
UL112	252 +		early pp family	-	(D) Spliced to UL113 (412,419, 615,616)
UL113	499		early pp family	-	(D) Spliced to UL112 (412,419, 615,616)
UL114	← 250 +		uracil glycosylase	+	(Δc, D) (438)
UL115	← 278		gL	+	(E) Complexed with gH/gO (224, 253,514)
UL116	← 344			-	gp? (313)
UL117	← 424 +			-	(313)
UL118	← 209			-	gp? (313)
UL119	← 142 +			-	gp? (313)
UL120	← 201 +			-	gp?
UL121	← 180 +			-	gp?
UL122	← 579 +		pp80 IE2	-	(T) Spliced (265,516,529,530)
UL123	← 491 +		pp72 IE1	-	(Δc, T) Spliced (9,190,382,516,529,530,603)
<i>ie1/ie2</i> enhancer-modulator					
UL124	152 +		ORF152	-	(Δc) (363,365)
UL124.1	54 +		ORF54	-	(Δ) gp? (190,281)
UL124.2	154 +		ORF154	-	(Δ) (190,281)
UL125	← 102			-	(Δ) gp? (190,281)
UL126	← 134			-	(Δ) (190)
UL126A	← 94		ORF94	-	(Δ) (281,598)
UL126.1	← 42		ORF42	-	(Δ) (281,598)
UL126.2	← 45		ORF45	-	(281)
UL126.3	← 55		ORF55	-	(281)
UL127	131 +			-	(Δ) (304,363,365)
UL128	← 139			-	(Δ) (363,365)
UL129	← 116			-	(Δ) (363,365)
UL130	← 214 +			-	gp?
UL131	← 76 +			-	gp?
UL132	← 270 +			-	(Toledo, 99 codons) (82)
UL133	257 +			-	gp?
UL134	← 175 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL135	328 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL136	240 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
				-	(Δ) (Toledo) (82)

Continúa

Nombre del gen	Tamaño (K-AUG)	Familia del gen	Producto del gen	Características de las proteínas	
				HC	Comentarios (referencias)
UL137	← 96 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL138	169 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL139	135 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL140	114 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL141	425 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL142	306 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL143	92 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL144	176 +		ppUL144, TNFR homolog	-	(Δ) gp (Toledo) (36,82,332)
UL145	100 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL146	117 +		vCXC-1	-	(Δ) gp a chemokine (Toledo and Towne) (82,418)
UL147	159 +		vCXC-2	-	(Δ) gp? a chemokine homolog (Toledo) (82,418)
UL148	316 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL149	122 +			-	(Δ) (Toledo) (82)
UL150	← 642 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL151	← 336 +			-	(Δ) gp? (Toledo) (82)
UL152	← 118 +	UL146	vCXC-1	-	(Δ) gp a chemokine (Towne) UL146 (82,418)
UL153	← 278 +			-	(Δ) gp? (Towne) (82)
UL154	← 399 +			-	(Δ) gp? (Towne) (82)
J1I	341			-	(Δ) Regions in common with J1L and J1S
IRS1	846 +	US22		-	(Δ*, T, M) 490 aa ident. to TRS1 (243,463,527)
US1	← 212	US1		-	(Δ) (243,278)
US2	← 199 +	US2	gpUS2	-	(Δ) (243,244,278,602)
US3	← 186 +	US2	gpUS3 IE	-	(Δ) (12,42,243,245,278,310,560,597)
US4	119			-	(Δ) (243,278)
US5	126 +			-	(Δ) (243,278)
US6	← 183 +	US6	gpUS6	-	(Δ) (13,213,243,278,316)
US7	← 225 +	US6		-	(Δ) gp? (243,278)
US8	← 227 +	US6		-	(Δ) gp? (243,278)
US9	← 247 +	US6	gpUS9	-	(Δ) (243,278,340)
US10	← 185 +	US6		-	(Δ) gp? (242,278)
US11	← 215 +	US6		-	(Δ) gp? (90,241,242,278,485,601)
US12	← 281 +	US12		-	(Δ) (278)
US13	← 261 +	US12		-	(Δ) (278)
US14	← 310 +	US12		-	(Δ) (389)
US15	← 484	US12		-	(Δ) (389)
US16	← 309 +	US12		-	
US17	← 393 +	US12		-	
US18	← 274 +	US12	pUS18	-	(196)
US19	← 240 +	US12	pUS19	-	(196)
US20	← 357	US12	pUS20	-	(196)
US21	← 239 +	US12		-	
US22	← 593	US22	ICP22, pUS22	-	(384)
US23	← 592 +	US22		-	
US24	← 500 +	US22		-	
US25	179			-	
US26	603 +	US22		-	
US27	362 +	7TM		-	(Δ) gp? similarity to GCR (49,94,576)
US28	323 +	7TM	gpUS28	-	(Δ) CC/CX ₃ C chemokine GCR (94,272,400,541,576)
US29	462 +			-	
US30	349 +			-	
US31	197	US1		-	
US32	183 +	US1		-	
US33	← 137			-	
US34	163 +			-	gp?

Continúa

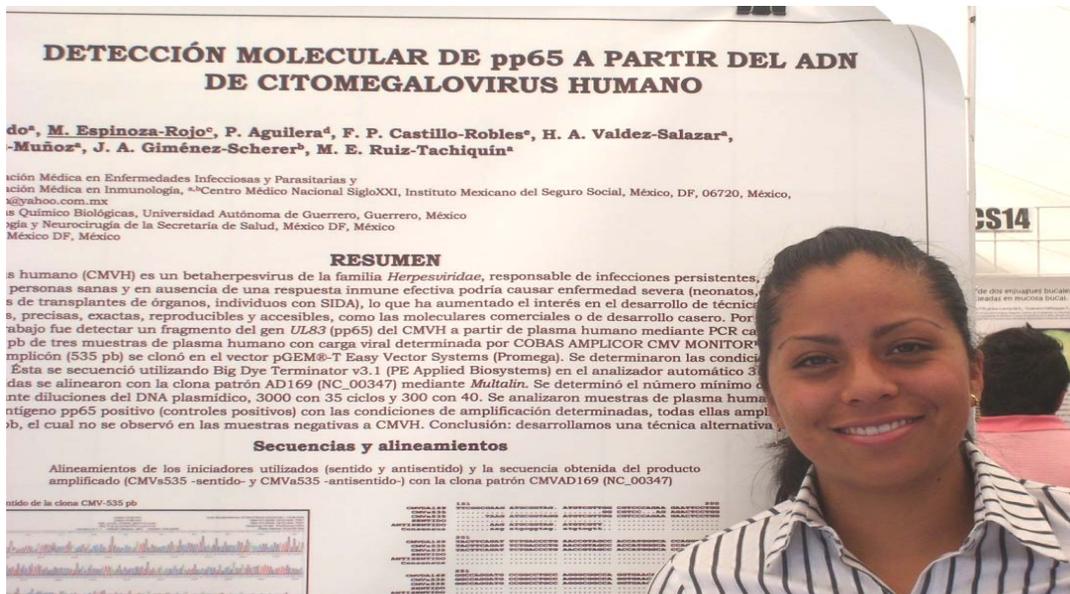
Nombre del gen	Tamaño (K-AUG)	Familia del gen	Producto del gen	Características de las proteínas	
				HC	Comentarios (referencias)
US35	= 109			-	
US36	= 110			-	
TRS1	= 788 +	US22	pTRS1	-	(T, M?) 490 aa ident. to IRS1 (231, 462,463,527)
J1S	= 224			-	Regions in common with J1I and J1L

* Referencias generales, ^(90,25).

ORF's, Marcos abiertos de lectura (tamaño de salida K-ATG; si se presenta); consensos Kozak-AUG (A/GXXAUG o AUGG); + Tamaño indicado de K-ATG; HC, herpesvirus conservado en *ORF*; aa, aminoácidos (aa individuales designados por un código de una sola letra); gp, glicoproteína; pp, fosfoproteína; ←, leftward *ORF*; ©, proteína de la cápside; (M), matriz o proteína del tegumento; €, proteína de envoltura; (D), replicación del ADN viral o metabolismo; (p), hendidura/empaquetamiento del genoma viral; (Δ) una parte ó todo el *ORF*'s es dispensable para el crecimiento de cultivos en células de FH (*significa que una copia es dispensable); (Δ_c), una parte o todo el *ORF*, es dispensable, muestran mutaciones que reducen el crecimiento en células FH; (T) transactivador; (A), anti-apoptótico; 7TM, receptor que abarca siete-transmembrana; GCR, G-proteína un par de receptores; ? posible o putativo.

ANEXO 2.

Reconocimiento del V encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia" 21-23 Mayo 2008 León Guanajuato.



FOTOGRAFÍA 1. Presentación del trabajo en el Centro de Investigación en Óptica.

ANEXO 3.



DETECCIÓN MOLECULAR DE pp65 A PARTIR DEL ADN DE CITOMEGALOVIRUS HUMANO

Y. Díaz-Galindo^a, M. Espinoza-Rojo^c, P. Aguilera-Hernández^d, F. P. Castillo-Robles^e,
H. A. Valdez-Salazar^a, M. T. Alvarez-Muñoz^a, J. A. Giménez-Scherer^b, M. E. Ruiz-Tachiquín^a

^aUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias y

^bUnidad de Investigación Médica en Inmunología, ^{a,b}Centro Médico Nacional SigloXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, México, DF, 06720, México, e:mail: mertachiquin@yahoo.com.mx

^cFacultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México

^dInstituto de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud, México DF, México

^eRoche Diagnostics, México DF, México

RESUMEN

El citomegalovirus humano (CMVH) es un betaherpesvirus de la familia *Herpesviridae*, responsable de infecciones persistentes, generalmente asintomáticas en personas sanas y en ausencia de una respuesta inmune efectiva podría causar enfermedad severa (neonatos, pacientes con cáncer, receptores de transplantes de órganos, individuos con SIDA), lo que ha aumentado el interés en el desarrollo de técnicas de detección y monitoreo rápidas, precisas, exactas, reproducibles y accesibles, como las moleculares comerciales o de desarrollo casero. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue detectar un fragmento del gen *UL83* (pp65) del CMVH a partir de plasma humano mediante PCR casero. Se amplificaron 535 pb de muestras de plasma humano con carga viral determinada por COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics). El amplicón (535 pb) se clonó en el vector pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Se determinaron las condiciones para la PCR con la clona. Ésta se secuenció utilizando Big Dye Terminator v3.1 (PE Applied Biosystems) en el analizador automático 3100 (ABI). Las secuencias obtenidas se alinearon con la clona patrón AD169 (NC_00347) mediante *Multalin*. Se determinó el número mínimo de copias/ml detectables mediante diluciones del DNA plasmídico, 3000 con 35 ciclos y 300 con 40. Se analizaron muestras de plasma humano con carga viral conocida y antígeno pp65 positivo (controles positivos) con las condiciones de amplificación determinadas, todas ellas amplificaron un producto de 535 pb, el cual no se observó en las muestras negativas a CMVH. Conclusión: desarrollamos una técnica alternativa para detectar CMVH.

INTRODUCCIÓN

El CMVH es un patógeno oportunista que pertenece a la familia betaherpesvirus, posee un genoma de DNA de doble cadena de aproximadamente 236 Kpb con 250 marcos de lectura abiertos¹, conformado por diferentes genes, entre ellos *UL55* que codifica para la glicoproteína B, la cual es una proteína de superficie y el blanco principal para neutralizar anticuerpos del hospedero; *UL83* que codifica para la proteína pp65, blanco de los linfocitos T CD8⁺ y la proteína estructural más abundante del virión; *UL112/113* (genes precoces, *Ie1/Ie2*) que son transactivadores requeridos para la replicación viral, y *UL54* que codifica para la DNA polimerasa, sitio de acción de componentes antivirales como el Ganciclovir, Aciclovir y Cidofovir². Varnum y colaboradores en el 2004 reportaron que el virión está formado por 50% de proteína de tegumento, 30% de proteínas de cápside, 13% de proteínas de envoltura y 7% de proteínas no definidas³.



V encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia
21-23 MAYO 2008 León, Guanajuato



Este virus afecta de un 60 a un 80% de la población humana, las personas inmunocompetentes son asintomáticas a él⁴. En una infección primaria puede causar mononucleosis⁴. Después de la primoinfección se establece un estado de latencia y aparece el riesgo de una reactivación⁴. En la infección latente, los monocitos CD14+ son el reservorio principal del virus², en contraste, durante la infección activa diversos tipos de células son afectados, entre los cuales están las células endoteliales, neutrófilos y monocitos³.

En individuos inmunocomprometidos como neonatos, pacientes con cáncer, receptores de trasplantes de órganos, individuos con SIDA y recién nacidos, el CMVH causa enfermedad severa⁵, lo que ha aumentado el interés en el desarrollo de técnicas de detección y monitoreo rápidas, precisas, exactas, reproducibles y accesibles, como las moleculares comerciales o caseras. Por lo que surgió nuestro interés en desarrollar una metodología alternativa a la antigenemia-pp65 a nivel molecular, una PCR de diseño casero, accesible tanto técnica como económicamente.

METODOLOGÍA

Muestras: plasmas humanos, con y sin carga viral-CMV, antigenemia pp65 positivos. El uso de éstos se hizo de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes.

Los siguientes procedimientos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación de la carga viral se llevó a cabo con COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics). El DNA de las muestras se extrajo a partir de 1 ml de plasma mediante QIAamp® UltraSens™ Virus Kit (QIAGEN). La purificación del producto de la PCR se llevó a cabo a partir del gel de agarosa con QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La clonación del amplicón de 535 pb se realizó con pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). La secuenciación de la clona CMV-535 pb se hizo con Big Dye Terminator v3.1 (ABI) y se empleó el secuenciador automático 3100 (ABI). Los alineamientos con la secuencia patrón AD169 (NC_00347) de los iniciadores utilizados y la clona CMV-535 pb se realizaron con el Software *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

La estandarización de la PCR se llevó a cabo haciendo variaciones de las concentraciones de MgCl₂ y de los iniciadores, así como utilizando diferentes temperaturas de alineamiento y número de ciclos.

Se preparó una curva a partir de diluciones seriadas de DNA plasmídico para determinar el número mínimo detectable de copias de DNA de CMV/ml, con las condiciones de la PCR determinadas previamente en muestras positivas y negativas a CMVH.

RESULTADOS

Se amplificó un fragmento de 535 pb a partir de una muestra con carga viral-CMV de 273'000 copias de DNA de CMV/ml. Este producto se clonó y purificó para secuenciarlo. En la figura 1 se muestran los alineamientos de los iniciadores utilizados (sentido y antisentido) y la secuencia obtenida del producto amplificado (CMVs535 –sentido- y CMVa535 –antisentido-) con la clona patrón-CMVAD169 (NC_00347).

La clona CMV-535 pb se usó para estandarizar las condiciones de la PCR, las cuales fueron: 1 µl de ADN, Buffer PCR 1x, MgCl₂ 0.5 mM, iniciadores 5 pmol de cada uno (sentido y antisentido), Amplificasa (BIOGÉNICA) 2.0 U y dinucleótidos trifosfato 0.8 mM de cada uno de ellos. Una etapa inicial de desnaturalización de 95°C/3 min y 40 ciclos: 95°C/1 min, 40°C/1 min, 72°C/1 min, finalmente 72°C/7 min.

Después de haber estandarizado las condiciones de la PCR, se realizó una curva de copias de DNA de CMV/ml a partir de diluciones seriadas de DNA plasmídico para determinar el número mínimo detectable de las mismas. Se realizaron dos ensayos a 35 y 40 ciclos (figura 2).



V Encuentro
Participación de la
Mujer
en la **Ciencia**
21-23 MAYO 2008 León, Guanajuato



```

151                                     200
CMVd169  TCGGGGGAAG ATCGGGTAG . ATGTCGTGG GGTCCAGAA GAATTCCTGG
CMV535  . . . . . TAAG ATCGGGTAGG ATGTCGTGG GGTCCAGAA GAATTCCTGG
SENIDO  . . . . . TAAG ATCGGGTAGG ATGTCGTGG GGTCCAGAA GAATTCCTGG
ANTESENIDO . . . . . TAAG ATCGGGTAGG ATGTCGTGG GGTCCAGAA GAATTCCTGG
CONSENSUS . . . . . TAAG ATCGGGTAGG ATGTCGTGG GGTCCAGAA GAATTCCTGG

201                                     250
CMVd169  TACTTCAGAT TCTGACCCCTG AACCGGAGCC ACCATGGGCA CCGAGTTCGG
CMV535  TACTTCAGAT TCTGACCCCTG AACCGGAGCC ACCATGGGCA CCGAGTTCGG
SENIDO  . . . . . TACTTCAGAT TCTGACCCCTG AACCGGAGCC ACCATGGGCA CCGAGTTCGG
ANTESENIDO . . . . . TACTTCAGAT TCTGACCCCTG AACCGGAGCC ACCATGGGCA CCGAGTTCGG
CONSENSUS . . . . . TACTTCAGAT TCTGACCCCTG AACCGGAGCC ACCATGGGCA CCGAGTTCGG

251                                     300
CMVd169  GGCACAGGATG CCGGCTCTGCC AGGGCGGCCA GGTGAACACG GCCCGATCTTT
CMV535  GGCACAGGATG CCGGCTCTGCC AGGGCGGCCA GGTGAACACG GCCCGATCTTT
SENIDO  . . . . . GGCACAGGATG CCGGCTCTGCC AGGGCGGCCA GGTGAACACG GCCCGATCTTT
ANTESENIDO . . . . . GGCACAGGATG CCGGCTCTGCC AGGGCGGCCA GGTGAACACG GCCCGATCTTT
CONSENSUS . . . . . GGCACAGGATG CCGGCTCTGCC AGGGCGGCCA GGTGAACACG GCCCGATCTTT

301                                     350
CMVd169  GGATTCCTGTT GTCGGAAATCC TCGTCGGTGT CCTCTCTGGG CCGCACGCGG
CMV535  GGATTCCTGTT GTCGGAAATCC TCGTCGGTGT CCTCTCTGGG CCGCACGCGG
SENIDO  . . . . . GGATTCCTGTT GTCGGAAATCC TCGTCGGTGT CCTCTCTGGG CCGCACGCGG
ANTESENIDO . . . . . GGATTCCTGTT GTCGGAAATCC TCGTCGGTGT CCTCTCTGGG CCGCACGCGG
CONSENSUS . . . . . GGATTCCTGTT GTCGGAAATCC TCGTCGGTGT CCTCTCTGGG CCGCACGCGG

351                                     400
CMVd169  GACTCGGCCCT TAAGCGCGCC GGGTGTGCATA ACCGCCGACG TGCACGCGCTT
CMV535  GACTCGGCCCT TAAGCGCGCC GGGTGTGCATA ACCGCCGACG TGCACGCGCTT
SENIDO  . . . . . GACTCGGCCCT TAAGCGCGCC GGGTGTGCATA ACCGCCGACG TGCACGCGCTT
ANTESENIDO . . . . . GACTCGGCCCT TAAGCGCGCC GGGTGTGCATA ACCGCCGACG TGCACGCGCTT
CONSENSUS . . . . . GACTCGGCCCT TAAGCGCGCC GGGTGTGCATA ACCGCCGACG TGCACGCGCTT

401                                     450
CMVd169  CCGCCAGGAT GCTGATTTGC GTTTCGGGCC CCGGGAAGTG GAGGGCGCCG
CMV535  CCGCCAGGAT GCTGATTTGC GTTTCGGGCC CCGGGAAGTG GAGGGCGCCG
SENIDO  . . . . . CCGCCAGGAT GCTGATTTGC GTTTCGGGCC CCGGGAAGTG GAGGGCGCCG
ANTESENIDO . . . . . CCGCCAGGAT GCTGATTTGC GTTTCGGGCC CCGGGAAGTG GAGGGCGCCG
CONSENSUS . . . . . CCGCCAGGAT GCTGATTTGC GTTTCGGGCC CCGGGAAGTG GAGGGCGCCG

451                                     500
CMVd169  CCAATGGGCC GCGCCCGGTT A . CCGCGGCG GTCCTCGCCT CCGTGTGTAC
CMV535  CCAATGGGCC GCGCCCGGTT A . CCGCGGCG GTCCTCGCCT CCGTGTGTAC
SENIDO  . . . . . CCAATGGGCC GCGCCCGGTT A . CCGCGGCG GTCCTCGCCT CCGTGTGTAC
ANTESENIDO . . . . . CCAATGGGCC GCGCCCGGTT A . CCGCGGCG GTCCTCGCCT CCGTGTGTAC
CONSENSUS . . . . . CCAATGGGCC GCGCCCGGTT A . CCGCGGCG GTCCTCGCCT CCGTGTGTAC

501                                     550
CMVd169  GATTCCTCTCG TCGGATTCGG ATCCGGTGGT CAGACGTTCC TCGTTCGGCTT
CMV535  GATTCCTCTCG TCGGATTCGG ATCCGGTGGT CAGACGTTCC TCGTTCGGCTT
SENIDO  . . . . . GATTCCTCTCG TCGGATTCGG ATCCGGTGGT CAGACGTTCC TCGTTCGGCTT
ANTESENIDO . . . . . GATTCCTCTCG TCGGATTCGG ATCCGGTGGT CAGACGTTCC TCGTTCGGCTT
CONSENSUS . . . . . GATTCCTCTCG TCGGATTCGG ATCCGGTGGT CAGACGTTCC TCGTTCGGCTT

551                                     600
CMVd169  GGGCGGACCC CCGCGTCTGC CCGTCCGAGG TGGTCCGGA CCGAAGCTTG
CMV535  GGGCGGACCC CCGCGTCTGC CCGTCCGAGG TGGTCCGGA CCGAAGCTTG
SENIDO  . . . . . GGGCGGACCC CCGCGTCTGC CCGTCCGAGG TGGTCCGGA CCGAAGCTTG
ANTESENIDO . . . . . GGGCGGACCC CCGCGTCTGC CCGTCCGAGG TGGTCCGGA CCGAAGCTTG
CONSENSUS . . . . . GGGCGGACCC CCGCGTCTGC CCGTCCGAGG TGGTCCGGA CCGAAGCTTG

601                                     650
CMVd169  CCGTGGATGC GATACTGGCT GGTGAAGGTG GGTGCTCCG TGTACTGAGG
CMV535  CCGTGGATGC GATACTGGCT GGTGAAGGTG GGTGCTCCG TGTACTGAGG
SENIDO  . . . . . CCGTGGATGC GATACTGGCT GGTGAAGGTG GGTGCTCCG TGTACTGAGG
ANTESENIDO . . . . . CCGTGGATGC GATACTGGCT GGTGAAGGTG GGTGCTCCG TGTACTGAGG
CONSENSUS . . . . . CCGTGGATGC GATACTGGCT GGTGAAGGTG GGTGCTCCG TGTACTGAGG

651                                     700
CMVd169  CCGCGCTGC AGCAGCAAT CCAATCCGAA AAGAGAGAGC GAGGCGAGG
CMV535  CCGCGCTGC AGCAGCAAT CCAATCCGAA AAGAGAGAGC GAGGCGAGG
SENIDO  . . . . . CCGCGCTGC AGCAGCAAT CCAATCCGAA AAGAGAGAGC GAGGCGAGG
ANTESENIDO . . . . . CCGCGCTGC AGCAGCAAT CCAATCCGAA AAGAGAGAGC GAGGCGAGG
CONSENSUS . . . . . CCGCGCTGC AGCAGCAAT CCAATCCGAA AAGAGAGAGC GAGGCGAGG

```

Figura 1. Alineamientos de los oligonucleótidos y fragmento amplificado del CMVH.

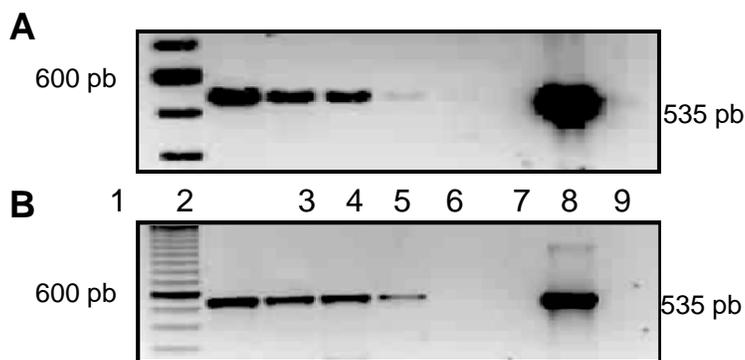


Figura 2. Número mínimo detectable de copias de DNA de CMV/ml mediante PCR. En un gel de agarosa se muestran las bandas del fragmento de 535pb con 35 ciclos (panel A) y 40 ciclos de amplificación (panel B), en los carriles de ambos paneles 1) marcadores de 100 pares de bases (pb), 2) 300'000 copias, 3) 30'000 copias, 4) 3'000 copias, 5) 300 copias, 6) 30 copias, 7) 3 copias de DNA de CMV/ml, 8) control positivo, DNA de la clona CMV-535 pb y 9) control negativo, sin

Como se observa en la figura 2 la intensidad de la banda aumenta conforme lo hace el número de copias de DNA de CMV/ml, para verificar que esto no fuera un artefacto de la técnica se realizaron amplificaciones de muestras con diferente carga viral. Además, como control interno de la técnica se llevaron a cabo amplificaciones del gen humano β -actina (gen constitutivo) para descartar la posibilidad de que la falta de amplificación de las muestras se debiera a degradación del DNA o los reactivos por si mismos. En la figura 3 se presentan las imágenes obtenidas de dicho análisis.DNA.



V encuentro
Participación de la
Mujer
en la
Ciencia
21-23 MAYO 2008 León, Guanajuato

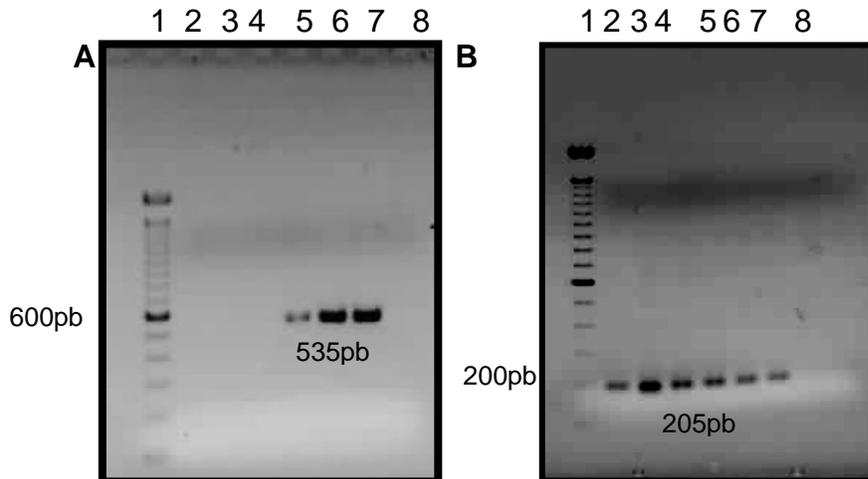


Figura 3. PCR de muestras negativas y positivas con carga viral conocida A) muestras negativas a CMVH (carriles 2, 3 y 4) junto con muestras con carga viral-CMV conocida [carriles 5) 15'100, 6) 273'000 y 7) >100'000 copias de DNA de CMV/ml], carril 8) control negativo, sin DNA, 40 ciclos de amplificación y B) mismas muestras, mismo orden, utilizadas para amplificar un fragmento (205 pb) del gen humano β -actina, gen constitutivo, como control interno de la técnica.

También se analizaron muestras reportadas como positivas al antígeno pp-65, de algunas de ellas se logró amplificar el fragmento de 535 pb, como se muestra en la figura 4.

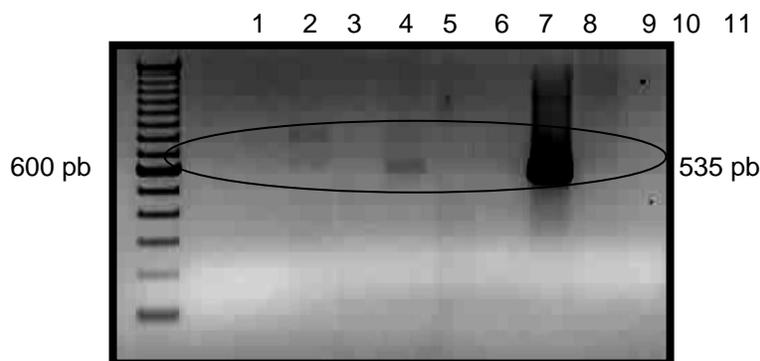


Figura 4. PCR de muestras positivas a antígeno pp65. Carriles 1) marcadores de 100 pb, 2) 42 células CMV+/200'000 leucocitos, 3) 148 células CMV+/200'000 leucocitos, 4) 71 células CMV+/gota directa, 5) 254 células CMV+/200'000 leucocitos, 6) células CMV+ incontables, 7) 110 células CMV+/200'000 leucocitos, 8) 110 células CMV+/200'000 leucocitos, 9) control positivo, DNA de la clona CMV-535 pb, 10) control negativo no relacionado, DNA de leucocitos, 11) control negativo, sin DNA.

DISCUSIÓN

La antigenemia y/o la carga viral son útiles en el monitoreo de individuos con riesgo de infección en la práctica clínica, estas tienen un pronóstico promedio de siete días antes de la aparición de los síntomas. Aunque el tratamiento antiviral se asocia con una disminución de las células positivas a antígeno pp65 u otros, utilizados como marcadores de infección, la respuesta no es inmediata, incluso se han observado cifras crecientes en la primera semana de tratamiento.



Una de las dificultades que presenta la técnica de antigenemia es el requerimiento de un número elevado de leucocitos, lo que no siempre es posible porque el recuento es bajo (leucopenia) o porque el volumen de muestra disponible no es suficiente. Por otro lado, las técnicas moleculares de amplificación de ácidos nucleicos como la PCR, han demostrado mayor eficiencia. Es muy importante notar que COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics) tiene un rango lineal de 600 a 100 000 copias de DNA de CMV/ml y nosotros fuimos capaces de detectar un mínimo de 300. Reconocemos que los productos amplificados de muestras reportadas antigenemia-pp65 positivas no presentan un amplificado con una banda clara, al respecto comentamos lo siguiente, la extracción de DNA a partir de este tipo de muestras se hizo de un volumen menor a 1 ml de plasma debido a que la muestra se utilizó para otras pruebas sin requerimiento de material libre de DNAsas, por lo que la cantidad a la que tuvimos acceso fue muy limitada (en todos los casos menor a 500 μ l) y quizás una posible degradación del DNA de las muestras antes de que llegarán a nuestras manos, éstas podrían ser las causas y explicaciones de que veamos una señal muy débil en la figura 4 en la mayoría de los carriles, ligeramente mas evidente en los carriles 4 y 6, que corresponden a muestras reportadas a gota directa (carril 4) y células incontables (carril 6), lo que significa que las muestras tenían un gran número de células CMV+. La técnica de antigenemia presenta problemas de estandarización, por lo que es muy importante que cada laboratorio establezca sus propios valores a la luz de su propia experiencia, que dependerán de su procedimiento técnico, así como del caso clínico a evaluar en particular. A título orientativo, la precisión es aceptable entre 10 y 250 células CMV+/preparación, más allá de este límite superior resulta extremadamente difícil realizar recuentos reproducibles y, por lo demás, tampoco es clínicamente necesario, pueden servir valores de antigenemia de 20 células CMV+/ 10^5 leucocitos en los transplantados de órgano sólido (quizá más elevados en el trasplante cardíaco) y de 2-5 células CMV+/ 10^5 leucocitos en los transplantados alogénicos de precursores hematopoyéticos. La PCR objeto de este trabajo no presenta este tipo de inconvenientes, ya que se estandarizó con ayuda de una clona que se obtuvo a partir de una muestra con carga viral de 273'000 copias de DNA de CMV/ml y los resultados obtenidos fueron reproducibles un mínimo de tres veces. Un punto importante ha considerar es, no existe una cifra que distinga entre dar o no tratamiento a un paciente, la decisión depende de la inmunosupresión a la cual esté sometido (<100 CD₄ en pacientes con VIH o bien pacientes trasplantados que estén en tratamiento con inmunosupresores) y las condiciones clínicas, se menciona que con que exista un incremento de la carga viral plasmática, aumenta la posibilidad de desarrollar enfermedad pero no se tiene una cifra de corte a la fecha. En los pacientes con trasplante de órgano(s) que se están siguiendo en forma preventiva, una carga viral de 5000 copias de DNA de CMV/ml puede ser tomada como positiva e iniciarse tratamiento preventivo (comunicación personal). Las decisiones de tratamiento se toman con base a los datos clínicos y de laboratorio, por lo que nosotros nos vemos comprometidos a ofrecer a los médicos y pacientes pruebas diagnósticas y de monitoreo que les sean de utilidad y que a los técnicos de laboratorio quienes las realizan, no les consuman tiempo excesivo de su jornada laboral por lo laborioso de las mismas, haciendo que éstas sean sencillas, reproducibles, exactas y económicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Homman-Loudiyi, K. Hultenby, W. Britt, C. Söderberg-Naucler, "Envelopment of cytomegalovirus occurs by budding into golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II", *J. Virol.* Vol. 77, 5, 2003, pp. 3191-3203.
2. V.C. Emery, "Investigation of CMV disease in immunocompromised patients", *J. Clin. Pathol.* Vol. 54, 2, 2001, pp. 84-88.
3. S.M. Varnum, D.N. Streblow, M.E. Monroe, P. Smith, K.J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D.G. 2nd Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R.D. Smith, J.A. Nelson, "Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome", *J. Virol.*, Vol. 78,20, 2004, pp. 10960-10966.
4. B. Sainz, H. LaMarca, R. Garry, C. Morris, "Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alfa/beta and interferon-gamma", *Virology Journal*, Vol. 2, 2005, pp. 14.
5. J. García-Ramírez, J. Ruchti, H. Huang, K. Simmen, A. Angulo, P. Ghazal, "Dominance of virus over host factors in cross-species activation of human cytomegalovirus early gene expression", *J. Virol.*, Vol. 75,1, 2001, pp. 26-35.