

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

Joaquín Mendoza Montero, Almudena Rojas González
Departamento de Investigación y Desarrollo. Vircell S.L. Granada

INTRODUCCIÓN

El virus de Epstein-Barr (VEB) afecta a la mayoría de los humanos. Cuando la infección se produce en la infancia, ésta es, habitualmente, asintomática; en los adolescentes, por el contrario, el virus representa la causa más importante de mononucleosis infecciosa. De todos los casos en que se consigue conocer la etiología, un 90% está producido por el VEB; el 10% restante podría tener su origen en las infecciones por *Toxoplasma gondii*, los adenovirus, el citomegalovirus (CMV) o el VIH. En las personas mayores de 25 años, el agente etiológico más frecuente de mononucleosis infecciosa es el CMV.

El VEB está implicado en la patogénesis de diferentes neoplasias: en la forma endémica del linfoma de Burkitt, en el carcinoma nasofaríngeo y en los síndromes linfoproliferativos postrasplante. También se le ha relacionado con los linfomas tipo Hodgkin y no-Hodgkin del sistema nervioso central, con la neumonitis intersticial linfocítica y con la leucoplaquia oral vellosa en los enfermos de sida. Por último, se le implica también en la patogénesis de algunos tumores de músculo liso en los inmunodeprimidos y en el carcinoma gástrico.

La infección se adquiere por transmisión oral. Tras una fase inicial de multiplicación en las células de la orofaringe, se produce la infección de los linfocitos B y otros tejidos del sistema reticuloendotelial. Después de la primoinfección, el virus persiste en fase de latencia, habitualmente de por vida, en los linfocitos B, las células endoteliales de la orofaringe y, quizá también, en el cuello de útero. Se han descrito reactivaciones acompañadas de la replicación y producción de viriones que, sin embargo, no suelen acompañarse de manifestaciones clínicas.

Se conoce un gran número de proteínas codificadas por el genoma del VEB. Durante la fase de latencia viral se expresan diversos antígenos en las células infectadas, que incluyen seis proteínas del tipo EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigens*), las tres proteínas latentes de membrana (LMP) y el antígeno de membrana detectable en los linfocitos (LYDMA). Durante la fase lítica aparecen, además, los antígenos precoces [*early antigens* (EA)], bien bajo el patrón de expresión celular difusa (EAd) o como restringidos (EA_r), así como el antígeno de la cápside (VCA).

LA RESPUESTA INMUNE EN LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

En los cuadros de mononucleosis infecciosa producidos por el VEB aparecen diversos anticuerpos, tanto frente a los antígenos específicos de este virus como, dependiendo de la edad, frente a proteínas no codificadas por él: los llamados anticuerpos heterófilos (AH), que se caracterizan por provocar la aglutinación de los eritrocitos de diversos mamíferos.

Al inicio de la infección aparecen anticuerpos del tipo IgM e IgG frente al VCA, y de la clase IgG frente al EAd. Los anticuerpos VCA-IgM y EAd-IgG se mantienen unos dos o tres meses, mientras que los de tipo IgG frente al VCA pueden seguir detectándose de por vida. Los anticuerpos frente a los antígenos EBNA no aparecen al inicio de la infección, sino unos meses más tarde, por lo general coincidiendo con el declinar de los anticuerpos VCA-IgM, y se mantienen igualmente de por vida. Aunque éste es el patrón de respuesta habitual (Figura 1 y Tabla 1), hay que tener en cuenta diversas situaciones excepcionales. Por ejemplo, los anticuerpos IgM frente al VCA pueden estar ausentes en la infección primaria, o persistir durante meses e incluso años; asimismo, la respuesta inmune al antígeno EBNA puede no aparecer nunca, o volverse negativa en el caso de una inmunodepresión; por último, en un 4-20% de las personas que han pasado la infección, la respuesta a los antígenos precoces puede persistir de manera excepcional, por lo que no pueden tomarse, de forma absoluta, como un marcador de infección reciente. Un patrón de infección pasada estaría definido por la presencia de anticuerpos VCA-IgG y anti-EBNA, junto con la ausencia de AH y de anticuerpos específicos del tipo VCA-IgM.

La respuesta de AH alcanza su valor máximo generalmente en la segunda o tercera semana del inicio de la enfermedad y se mantiene durante varios meses. Son anticuerpos de tipo IgM principalmente, aunque también se han detectado de las clases IgA e IgE; sólo en un 5% de los casos, estos anticuerpos son del tipo IgG. Obviamente, este tipo de anticuerpos no está relacionado con antígenos específicos del VEB.

Figura 1. Evolución de los anticuerpos en la mononucleosis infecciosa.

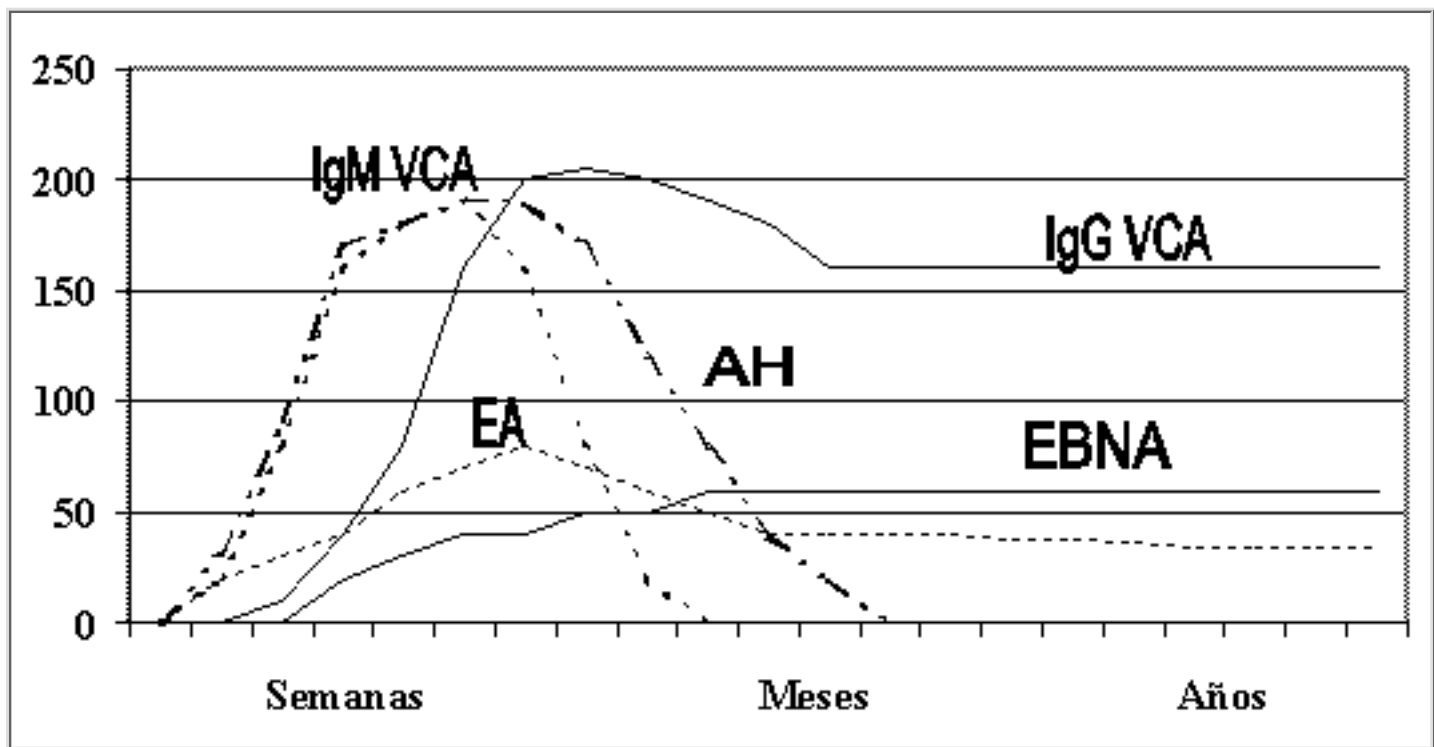


Tabla 1. Marcadores serológicos en las infecciones por el VEB.

Situación	Tipo de anticuerpos ^a					
	Heterófilos	VCA-IgM	VCA-IgG	Anti-EAd	Anti-EAr	Anti-EBNA
No infectados	-	-	-	-	-	-
Mononucleosis	+	+	+	+	-	-
Infección antigua	-	-	+	-	-	+
Reactivación	-	-	+	-	+	v
Linfoma de Burkitt	-	-	+	-	+	+
Carc. nasofaríngeo	-	-	+	+	-	+

^a+: presente; - : ausente; v: variable

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA

Dada la posible confusión de este cuadro, desde el punto de vista clínico, con enfermedades hematológicas, es esencial utilizar para su diagnóstico una prueba diagnóstica que tenga, a la vez, una alta sensibilidad y especificidad. Un falso negativo podría inducir a iniciar tratamientos erróneos o, al menos, a prolongar la angustia del enfermo de forma innecesaria. Por otra parte, un falso positivo puede retardar el tratamiento de la enfermedad tumoral por un tiempo inaceptable. Es, por tanto, muy importante disponer de técnicas rápidas, fiables y de realización prácticamente individualizada. Por razones obvias, el diagnóstico serológico deberá hacerse, en la mayor parte de ocasiones, sobre una única muestra de la fase aguda.

El diagnóstico serológico de la mononucleosis infecciosa por el VEB puede realizarse mediante la detección de AH, o empleando pruebas serológicas específicas que detectan la presencia de anticuerpos producidos frente a los antígenos del VEB. La aparición precoz de los AH y de VCA-IgM, junto con el perfil específico de otros tipos de marcadores serológicos en los enfermos con este síndrome, permite el diagnóstico en una única muestra de suero coincidiendo con la aparición de los síntomas.

Para la detección de los AH se han empleado técnicas de hemaglutinación, de aglutinación con látex, inmunoenzimáticas e inmunocromatográficas. Algunas de estas pruebas son muy populares por la facilidad y rapidez de realización, su bajo coste y por medir anticuerpos de una forma eficiente en el subgrupo de edad (la adolescencia) en donde encontramos la mayor parte de los casos clínicos. No obstante, la existencia de una gran cantidad de sistemas comerciales con diferente diseño y resultados complica su utilización en la práctica. Como regla general, cuando se utilizan técnicas de hemaglutinación, se deben elegir pruebas que empleen hematíes de caballo y absorción con células de riñón de cobaya para retirar los anticuerpos del tipo Forssman (anticuerpos naturales).

Los AH aparecen en el 90-96% de los enfermos adultos con el síndrome de mononucleosis infecciosa por el VEB. En estas condiciones, la detección de estos anticuerpos (por ejemplo, mediante la técnica clásica de Paul-Bunnell-Davidsohn), constituye la prueba fundamental para el diagnóstico. Sin embargo, es bien conocido que hasta un 50% de los niños menores de 5 años no

desarrolla AH, pero el hecho de que este cuadro no sea muy frecuente en este segmento de población mantiene la validez general de la detección de esos anticuerpos. Es necesario resaltar, además, que los AH no aparecen en las infecciones por otros herpesvirus, por lo que, en ocasiones, ayudan a diferenciar cuadros de mononucleosis originados por el CMV de los causados por el VEB.

La determinación de los AH puede hacerse también con antígenos de hematíes altamente purificados, mediante pruebas de látex o inmunocromatográficas, sin necesidad de absorción previa, mejorando así la especificidad. Con frecuencia, ante una posible mononucleosis, es necesario disponer de los resultados rápidamente y es aquí donde radica la mayor utilidad de las pruebas de AH. El laboratorio deberá escoger, de entre las pruebas disponibles, aquellas que sean las más específicas, aunque sea a costa de una pérdida de sensibilidad. En estas condiciones, un resultado positivo junto con un cuadro clínico compatible, puede permitirnos dar una información preliminar útil.

El diagnóstico de la mononucleosis infecciosa mediante técnicas de detección de anticuerpos producidos frente a los antígenos específicos del VEB, se basa habitualmente en la detección de los anticuerpos VCA-IgM. Un inconveniente de esta determinación es que puede ser positiva en los enfermos con infección por el CMV, debido a un estímulo policlonal. Inversamente, también se ha observado que hasta en un 30% de los casos de mononucleosis atribuibles al VEB pueden detectarse anticuerpos IgM específicos frente al CMV. Sin embargo, un título alto de los anticuerpos VCA-IgG, junto con la positividad de los anticuerpos anti-EA y la ausencia (o títulos bajos) de los anticuerpos anti-EBNA, puede ser igualmente indicativo de una infección aguda por el VEB.

Para la detección de antígenos específicos frente a VEB se utilizan, habitualmente, técnicas de inmunofluorescencia (IFI) y ELISA. La determinación de VCA-IgM debe realizarse tras separar la fracción de las inmunoglobulinas IgM del suero mediante cromatografía o una vez tratadas las muestras con un antisuero anti-IgG humana que elimine este tipo de inmunoglobulinas. De otra forma, conduciría a una falta de sensibilidad de la prueba, por competencia con las IgG específicas, así como de especificidad, por la presencia del factor reumatoideo.

Las técnicas de IFI son más específicas, pero son más laboriosas, difíciles de interpretar y requieren personal bien entrenado, por lo que sería deseable la utilización de pruebas de más fácil ejecución y más objetivas, como las de ELISA, aunque, en la actualidad, la mayoría de los laboratorios siguen empleando aquéllas. La IFI está especialmente indicada para la confirmación de los resultados dudosos por ELISA, como técnica de la investigación y como método de referencia para la evaluación de otros. Se pueden encontrar técnicas de ELISA, para medir anticuerpos a VCA, con antígenos crudos, gp125 purificada o con proteínas recombinantes (p18) con una sensibilidad y especificidad que oscilan entre el 54 y el 100%. En general, puede alcanzarse una mayor sensibilidad en las pruebas que emplean antígenos no purificados, pero a costa de una menor especificidad. Para la detección de anticuerpos contra el complejo EBNA, se pueden utilizar técnicas de inmunofluorescencia anticomplementaria o de ELISA, empleando antígenos recombinantes, con una sensibilidad entre el 86% y el 100%, y una especificidad que oscila entre el 79% y el 100%. Existen igualmente pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-EA también con antígenos recombinantes: la sensibilidad y especificidad son del 92% y 94%, respectivamente.

Se han realizado estudios que determinan la avidez de los anticuerpos IgG frente al VCA y el EA, mediante técnica de IFI, con buenos resultados. Estas técnicas tendrían un papel relevante en las infecciones agudas que cursan con ausencia o bajos niveles de IgM anti-VCA. También en la fase de convalecencia en la que persisten o se reactivan los anticuerpos VCA-IgM, o en ausencia de anti-EBNA debido a una inmunodepresión.

Como vemos, a pesar de los grandes avances que se han conseguido en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa por el VEB, éste es un campo que todavía cabe perfeccionar. Sin embargo, la mayor dificultad a la hora de evaluar los resultados de los estudios de las nuevas técnicas serológicas, es la ausencia de un buen patrón de referencia, como sería el cultivo del microorganismo, si éste fuese factible en la práctica. Por esta razón, la mayor parte de las comparaciones con los nuevos métodos o marcadores, se realizan enfrentándolos a técnicas serológicas ya existentes, lo que puede complicar su interpretación. A esto debíamos añadir las limitaciones metodológicas (pequeño tamaño de la muestra, por ejemplo), presentes en algunos estudios. Por último, puesto que el período de vigencia de las verdades científicas es, por definición, limitado, deberíamos preguntarnos si no puede haber otros posibles agentes etiológicos del cuadro de mononucleosis infecciosa no conocidos hasta el momento que pudieran explicar algunos patrones serológicos atípicos.

A modo de resumen, se podría concluir que, en el diagnóstico serológico de la mononucleosis por el VEB se pueden emplear, como cribado, las técnicas de detección de AH. Cuando éstas son negativas, o en pacientes con sintomatología atípica, es necesario el empleo de técnicas de detección de anticuerpos específicos. Una estrategia razonable para abordar el diagnóstico sería emplear, conjuntamente, una prueba de AH y otra de VCA-IgM. Otra posible alternativa es la de emplear una técnica de detección de anticuerpos anti-EBNA, puesto que un resultado positivo por una técnica suficientemente sensible, excluiría un diagnóstico de infección reciente por el VEB en la mayor parte de los casos. Caso de ser negativa la detección de anti-EBNA, habría que realizar una determinación de IgM frente al VCA. Hay que volver a insistir, por último, que la utilización de las pruebas serológicas específicas es fundamental en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa en los niños menores de 5 años.

EI VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y SU RELACIÓN CON PROCESOS TUMORALES

El VEB es el principal agente oncogénico linfotrópico dentro del grupo de los herpesvirus. En las neoplasias asociadas al VEB, el diagnóstico serológico tiene una aplicación menor que en la mononucleosis, pues frecuentemente presentan una respuesta de anticuerpos anómala. En estos enfermos es donde las técnicas de detección de antígenos o de ácidos nucleicos pueden ser útiles. Tras la infección primaria el virus es excretado de forma intermitente en las secreciones orofaríngeas durante toda la vida, por lo que el aislamiento del virus tiene poca significación.

En el linfoma de Burkitt, en el carcinoma nasofaríngeo y en los inmunodeprimidos, se encuentran títulos altos de anticuerpos

frente al VCA y el EA. La respuesta frente al EA está dirigida al EA_r en el linfoma de Burkitt y en los inmunodeprimidos, mientras que en el carcinoma nasofaríngeo se detectan anticuerpos frente al patrón difuso del antígeno temprano (EA_d).

La mayor parte de los enfermos con carcinoma nasofaríngeo desarrollan respuesta de IgA a diferentes proteínas del VEB. Las pruebas serológicas más utilizadas en esta situación son la determinación de IgA frente al VCA y EA. Recientemente, se ha estudiado que la detección de IgA frente a la glucoproteína mayor de la envuelta gp350 podría ser igualmente útil. Estas determinaciones tienen valor tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la evolución de este tipo de tumor. Algunos estudios indican que los títulos elevados a VCA y EA_r tendrían valor pronóstico en el linfoma de Burkitt.

En algunos individuos la infección queda activa de forma crónica, con títulos elevados a las proteínas de la fase replicativa del ciclo viral. Aparecen síntomas persistentes, tales como esplenomegalia, y se produce un patrón recurrente que dura meses o años, que se manifiesta, por ejemplo, por una pancitopenia. En estos enfermos, suelen detectarse títulos elevados de anticuerpos anti-VCA y anti-EA, sin la presencia concomitante de anti-EBNA.

El otro tipo de técnicas que tiene aplicación -fundamentalmente en laboratorios de investigación- en los carcinomas asociados al VEB es la determinación de algunos antígenos virales en los tejidos, así como la detección del DNA o el mRNA del virus. Los antígenos se expresan en tan poca cantidad en las células que hay que recurrir a técnicas de inmunofluorescencia anticplemento para poder demostrar su presencia. Las técnicas de biología molecular pueden detectar tanto virus defectivos como infecciosos, pero su especificidad cuando se aplican sobre muestras de tejidos no es muy alta, pues detectan genomas presentes en los linfocitos circulantes. Para demostrar el DNA en los tejidos se ha empleado el *southern blot*, el *dot blot*, la PCR y la hibridación *in situ*. Se han descrito también aplicaciones de la PCR para linfocitos y suero.

El mayor problema actual de las técnicas de biología molecular (especialmente la PCR cualitativa) deriva de su gran sensibilidad, que hace de ellas marcadores poco específicos de los cuadros clínicos causados o asociados al VEB. Para obviar esta limitación, en el síndrome linfoproliferativo postrasplante, empleando una PCR cuantitativa en linfocitos, es posible encontrar un punto de corte con el que se obtiene una alta sensibilidad y especificidad. Otros autores han desarrollado técnicas de PCR en suero, asumiendo que sólo se detectaría genoma vírico en los pacientes con una alta carga sistémica de VEB, lo que se correlacionaría con la presencia de un proceso linfoproliferativo postrasplante. Esta técnica debería de aplicarse con precaución en los trasplantes pediátricos, en los que la prueba podría ser positiva debido a una primoinfección por VEB. Una tercera estrategia sería la detección, mediante el método de amplificación NASBA, de diversos mRNA del VEB (transcritos de los genes EBNA1, LMP1, LMP2, BARF1 y el no codificante EBER1). Así, el EBNA 1 aparece en cualquier tipo de linfoma asociado al VEB. El mRNA del LMP2, en los linfomas Hodgkin y en el carcinoma nasofaríngeo. Por último, el BARF1 parece estar relacionado con el carcinoma nasofaríngeo. Todas estas técnicas abren puertas que deben ser concretadas con una más amplia experiencia.

BIBLIOGRAFIA

- Bazzichi A, Guidi FV, Rindi L, Incaprera M, Garzelli C. PCR ELISA for the quantitative detection of Epstein-Barr virus genome. *J Virol Methods* 1998; 74:15-20.
- Ho DWT, Field PR, Cunningham AL. Rapid diagnosis of acute Epstein-Barr virus infection by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific immunoglobulin M (IgM) antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. *J Clin Microbiol* 1989; 27:952-958.
- Jenson HB, Ench Y, Sumaya CV. Epstein-Barr virus. En: Rose NR, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (5ª ed). American Society for Microbiology. Washington, 1997; 634-643.
- Limaye AP, Huang M-L, Atienza EE, Ferrenberg JM, Corey L. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipient with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1113-1116.
- Linderholm M, Boman J, Juto P, Linde A. Comparative evaluation of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus-specific serology. *J Clin Microbiol* 1994; 32:259-261.
- Liu MY, Chang YL, Ma J, Yang HL, Hsu MM, Chen CJ, Chen JY, Yang CS. Evaluation of multiple antibodies to Epstein-Barr virus as markers for detecting patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Med Microbiol* 1997; 52:262-269.
- de Ory F, Antonaya J, Fernández MV, Echevarría JM. Application of low avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1669-1671.
- Picazo JJ, Fuertes A. Infección por el virus Epstein-Barr. *Protocolos de diagnóstico serológico comentado* (nº 8). 1998.
- Svahn A, Magnusson M, Jägdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, Linde A. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2728-2732.