



Facultad de Medicina y Cirugía

Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia

Programa de doctorado 3139 Medicina

TESIS DOCTORAL

**EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA PRIMOINFECCIÓN POR EL
VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN NIÑOS**

Presentado por:

Mónica García Peris

Licenciada en Medicina y Cirugía

Dirigida por:

Dr^a Julia Colomer Revuelta

Dr^a Damiana González Granda

Valencia, Octubre de 2019

Dña. Julia Colomer Revuelta, Doctora en Medicina, Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València,

Dña. Damiana González Granda, Doctora en Medicina, Jefa del Servicio de Microbiología del Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva, Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Evolución serológica de la primoinfección por el virus de Epstein-Barr en niños**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **Mónica García Peris**, Licenciada en Medicina y Cirugía, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado 3139 en Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 23 de Octubre de 2019.

Fdo. Julia Colomer Revuelta

Fdo. Damiana González Granda

A mis hijos, Diego y Carla,

a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Este tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y el entusiasmo en conocer mejor al “enigmático” virus de Epstein-Barr que me transmitieron Damiana y Macarena. Gracias por vuestra disponibilidad en el laboratorio para intercambiar conocimientos con los clínicos, a pesar de vuestra carga asistencial, sin la cual no surgirían trabajos como este.

Gracias a mis compañeras Marisa y Yolanda, por su inestimable ayuda como co-investigadoras en el trabajo de campo y en todos los obstáculos que han ido surgiendo, sin sus ánimos no me hubiera sido posible seguir adelante.

En especial a Pura y Bebes, “mis enfermeras” del Hospital de día, por su desinteresada colaboración e implicación con los niños del estudio y sus familias, sin su trabajo no hubiera sido posible realizar este estudio.

A los pacientes y sus familias, por su implicación y su tiempo y por ser la motivación de nuestra curiosidad científica.

A Julia Colomer y a Fernando Calvo por sus ánimos para terminar este proyecto.

A mi familia y amigos por su paciencia y apoyo en los momentos difíciles que se han cruzado en este proyecto. A mis hijos, Diego y Carla, por ser el “motor” de mi vida.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN:	21
1.1. EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB)	21
1.1.1. <i>Epidemiología</i>	27
1.2. PRIMOINFECCIÓN POR EL VEB Y ENFERMEDADES ASOCIADAS	29
1.2.1. <i>Enfermedades asociadas al VEB</i>	31
1.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VEB	37
1.3.1. <i>Respuesta inmune innata</i>	37
1.3.2. <i>Respuesta inmune humoral específica. Evolución serológica</i>	38
1.3.3. <i>Respuesta inmune celular</i>	47
1.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN LA INFECCIÓN POR VEB.....	52
1.4.1. <i>Detección de anticuerpos específicos</i>	52
1.4.2. <i>Técnicas de diagnóstico molecular</i>	55
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	65
3. OBJETIVOS	71
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	71
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	71
4. PACIENTES Y MÉTODO	75
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	75
4.2. ÁMBITO DEL ESTUDIO	75
4.3. PERÍODO DE ESTUDIO.....	75
4.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	76
4.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	76
4.6. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	77
4.7. MUESTREO	77
4.8. VARIABLES.....	77
4.8.1. <i>Datos sociodemográficos:</i>	78
4.8.2. <i>Datos clínicos</i>	79
4.8.3. <i>Datos analíticos:</i>	80
4.8.4. <i>Datos microbiológicos:</i>	81

4.8.5. <i>Datos sobre la función inmune</i>	85
4.9. PROTOCOLO DEL ESTUDIO	86
4.10. DEFINICIONES UTILIZADAS.....	91
4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	92
4.11.1. <i>Estudio descriptivo</i>	92
4.11.2. <i>Estudio analítico</i>	93
4.12. ASPECTOS ÉTICOS.....	96
4.13. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	97
5. RESULTADOS.....	101
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	101
5.1.1. <i>Características sociodemográficas</i>	101
5.1.2. <i>Características clínicas</i>	104
5.1.3. <i>Datos analíticos</i>	106
5.1.4. <i>Datos microbiológicos</i>	106
5.1.5. <i>Datos de coinfección</i>	107
5.2. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA	111
5.3. INDEPENDENCIA Y CONCORDANCIA ENTRE IGM VCA E IGG EBNA	122
5.4. ASOCIACIÓN DE LAS VARIABLES CON EL ESTADO DE SEROCONVERSIÓN Y EL TIEMPO HASTA LA MISMA	124
5.4.1. <i>Sexo</i>	124
5.4.2. <i>Edad</i>	125
5.4.3. <i>Clínica y analítica durante la primoinfección</i>	126
5.4.4. <i>Presencia de ADN viral</i>	127
5.5. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES SEGÚN EL MODELO DE SUPERVIVENCIA	127
5.6. PROBABILIDAD DE NO REALIZAR SEROCONVERSIÓN	129
5.7. RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN INMUNE CELULAR, AUSENCIA DE SEROCONVERSIÓN Y ADN VIRAL POSITIVO.....	132
6. DISCUSIÓN	141
6.1. CARACTERÍSTICAS DURANTE LA PRIMOIINFECCIÓN	141
6.1.1. <i>Características epidemiológicas</i>	141
6.1.2. <i>Características clínicas</i>	143
6.1.3. <i>Características analíticas</i>	145
6.1.4. <i>Datos microbiológicos</i>	146

6.1.5. Datos de coinfección	148
6.2. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA TRAS LA PRIMOIINFECCIÓN	150
6.2.1. IgM VCA	150
6.2.2. IgG EBNA	151
6.2.3. ADN viral	153
6.3. INDEPENDENCIA Y CONCORDANCIA ENTRE IgM VCA E IgG EBNA	155
6.4. VARIABLES ASOCIADAS CON LA SEROCONVERSIÓN	157
6.5. PROBABILIDAD DE NO REALIZAR SEROCONVERSIÓN	162
6.6. FUNCIÓN INMUNE CELULAR.....	163
6.6.1. Pacientes con IgG EBNA negativos	164
6.6.2. Pacientes con ADN viral positivo	166
6.7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	167
7. CONCLUSIONES	173
8. BIBLIOGRAFÍA	179
9. ANEXOS	193

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

AH: Anticuerpos heterófilos

BARTs: *BamHI A rightward transcripts*. Fragmentos codificados a la derecha de *BamHI*

BRF-2: Glicoproteína de la envoltura viral, con receptor en las células epiteliales

CAVEB: *Chronic active Epstein-Barr virus infection*. Infección crónica por el VEB

CLIA: *Chemiluminescence immunoassay*. Técnicas de quimioluminiscencia

CMV: Citomegalovirus

CTL: *Cytotoxic T lymphocytes*. Linfocitos T citotóxicos

EA-EA(D): Early antigen (Diffuse). Antígeno precoz

EBERs: *Epstein-Barr encode small RNA*. Fragmentos pequeños codificados por ARN

EBNA: *Epstein-Barr nuclear antigen*. Antígeno nuclear del VEB

ELISA: *Enzyme-linked immunoabsorbent assays*. Técnicas enzimáticas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo

gH/gI: Glicoproteína de la envoltura viral, con receptor en las células epiteliales

GOT: Aspartato aminotransferasa o transaminasa glutámico-oxalacética

GPT: Alanino aminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica

gp350: Glicoproteína de la envoltura viral con receptor en los linfocitos B

gp42: Glicoproteína de la envoltura viral con receptor en los linfocitos B

HLA: *Human leukocyte antigen*. Antígeno leucocitario humano

IF/IFA: *Immunofluorescence assays*. Técnicas de inmunofluorescencia

IFAC: Inmunofluorescencia anti-complementémica

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN-gamma: Interferón gamma (citocina producida por los linfocitos CD4 y los NK)

IgG: Inmunoglobulina de clase G

IgG AP: Inmunoglobulina G frente al antígeno precoz

IgM: Inmunoglobulina de clase M

LPM: *Latent membrane protein*. Proteínas de membrana expresadas en la fase de latencia

MI: Mononucleosis Infecciosa

NK: Células *natural killer*

PCR: *Polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

SGA: Streptococo pyogenes del grupo A

TLR: *Toll like receptor*. Receptor de tipo Toll, receptores de membrana importantes en el reconocimiento de antígenos

VCA: *Viral capsid antigen*. Antígeno de la cápside viral

VEB: Virus de Epstein-Barr

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Estructura del VEB	22
Figura 2. Ciclo biológico del VEB	25
Figura 3. Cinética de los anticuerpos específicos y de la carga viral tras la primoinfección sintomática por el VEB.	40
Figura 4. Diagrama de seguimiento durante el estudio.....	90
Figura 5. Distribución de los casos según la edad en la primoinfección	102
Figura 6. Estacionalidad en el momento de la primoinfección.....	103
Figura 7. Evolución serológica en cada período del estudio	112
Figura 8. Seguimiento de los pacientes hasta los 24 meses tras la primoinfección	116
Figura 9. Seguimiento de los pacientes a partir de los 24 meses tras la primoinfección	117
Figura 10. Diagrama de cajas para la edad según la IgM VCA	125
Figura 11. Diagrama de cajas para la GOT y la GPT según el tiempo hasta salir del estudio	126
Figura 12. Probabilidad de no seroconversión tras la primoinfección por VEB	131

TABLAS

Tabla 1. Tipos de latencia en algunas enfermedades asociadas al VEB	36
Tabla 2. Datos publicados sobre la Evolución serológica tras una primoinfección por VEB.....	42
Tabla 3. Estudios prospectivos sobre la primoinfección por el VEB ..	44
Tabla 4. Métodos diagnósticos para la detección del VEB	56
Tabla 5. Métodos para medir la carga viral del VEB	59
Tabla 6. Manifestaciones clínicas durante la primoinfección	104
Tabla 7. Coinfecciones detectadas durante la primoinfección por el VEB	107
Tabla 8. Características según el tipo de clínica en la primoinfección	110
Tabla 9. Características serológicas, virológicas e inmunes en cada período del estudio	112
Tabla 10. Características de los casos con ADN viral positivo.....	119
Tabla 11. Subpoblaciones linfocitarias alteradas a los 18 y 24 meses	121
Tabla 12. Análisis de independencia (test de Fisher) y concordancia (k no ponderada de Cohen) entre los marcadores serológicos IgG EBNA e IgM VCA	123
Tabla 13. Resultados del análisis de supervivencia mediante regresión de Cox (tiempo hasta IgM VCA negativa e IgG EBNA positivos)	128

Tabla 14. Asociación entre no seroconversión (IgG EBNA negativos a los 12 meses) y poblaciones linfocitarias a los 18 y 24 meses de la primoinfección 133

Tabla 15. Disfunción inmune en los casos “Respondedores tardíos” 134

Tabla 16. Disfunción inmune en los pacientes “no respondedores” 135

Tabla 17. Asociación entre no seroconversión (ADN positivo a los 12 meses) y poblaciones linfocitarias 136

Tabla 18. Disfunción inmune en los pacientes con ADN VEB positivo 137

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB)

El virus de Epstein-Barr (VEB) fue descubierto en 1964 por Epstein, Achong y Barr, a partir de cultivos de células de linfoma de Burkitt. Cuatro años más tarde se relacionó con la mononucleosis infecciosa (MI), su manifestación más frecuente.

Se trata de un virus de la familia herpes, subfamilia gamma-herpesvirinae, también llamado herpesvirus tipo 4, aunque en la bibliografía y en el ámbito científico se le sigue llamando por su nombre histórico.

La estructura del VEB es la típica de los virus de la familia herpes. Las partículas infecciosas maduras miden entre 150-200 nanómetros de diámetro. Están formadas por un núcleo de ADN, rodeado de una nucleocápside icosaédrica y por fuera de ella un tegumento formado por proteínas y una envoltura lipídica con glicoproteínas a modo de espículas tal y como se puede ver en la figura 1. El genoma se compone de unas 172.000 parejas de bases de ADN de doble cadena que codifican casi 100 proteínas. Se conoce la secuencia completa de nucleótidos de una cepa (1). Dentro de una partícula vírica el genoma

es lineal. En cambio, dentro de las células con infección latente el genoma es un plásmido extracromosómico circular o episoma, aunque en algunas células también puede estar integrado en el cromosoma de la célula (2).

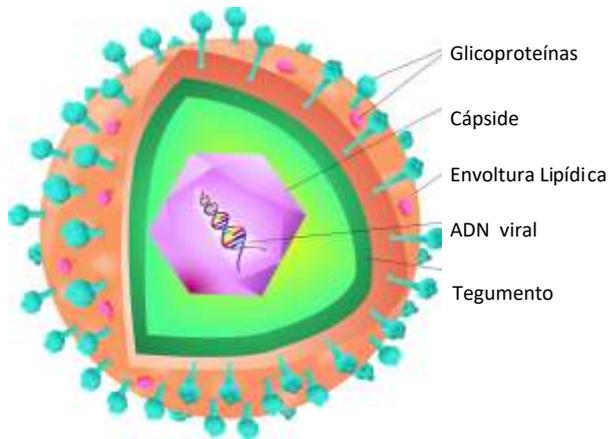


FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL VEB

El VEB es un virus con tropismo por los linfocitos B, células del epitelio oral, células del epitelio parotídeo y células del epitelio cervical uterino. Para poder penetrar en ellas requiere la actuación de las glicoproteínas de la envoltura viral, BMRF-2 y gH/gL en células epiteliales, y gp350 y gp42 en linfocitos B, con integrinas y receptores CD21 respectivamente, desencadenando la fusión de membranas y la

entrada del virus en la célula. En el interior de la célula la cápside viral se disuelve y el genoma viral es transportado al núcleo (3). Algunos antígenos de la cápside, como el p-18, p-72 y p-23 son capaces de generar anticuerpos IgM e IgG útiles para el diagnóstico de la infección, aunque sólo las IgG frente al p-18 se detectan en la infección antigua, y no desaparecen en inmunodeprimidos (4).

En los años 80 fueron identificados dos genotipos del VEB (VEB-1 y VEB-2) con diferencias en sus cadenas de ADN. Los estudios sugieren diferencias geográficas en su prevalencia, con una distribución de los dos genotipos en África central y resto de lugares, pero mayor prevalencia del tipo 1 en los países occidentales. La mayoría de las personas son infectadas por un único genotipo, aunque las personas inmunocomprometidas pueden ser coinfectadas por ambos genotipos. Estudios posteriores han revelado la presencia de varias cadenas del VEB en individuos sanos (5), e incluso se han descrito diferentes genomas según la región geográfica (6). Además, vamos conociendo datos sobre las diferentes cadenas del virus y su interacción con el huésped (7).

El virus se transmite de forma directa por las secreciones orales mediante los besos de la persona infectada o mediante el intercambio de saliva de niño a niño como sucede en las guarderías. Los contactos no íntimos y los fómites no contribuyen a su propagación, ya que el virus no sobrevive mucho tiempo fuera de las

secreciones. No parece existir una predisposición estacional de la infección ni tampoco según el sexo (3,8).

Tal y como se muestra en la figura 2, en la primoinfección, el VEB de la saliva infecta a los linfocitos B vírgenes de la orofaringe. Los linfocitos B infectados, se transforman y proliferan como blastos activados, pero finalmente son controlados por los linfocitos T citotóxicos (CTL en la figura) y por las células NK. Después de la convalecencia, el VEB persiste como infección latente en forma de ADN episomal en las células B memoria. Ocasionalmente las células B memoria se pueden diferenciar a células plasmáticas que entran de nuevo en ciclo lítico produciendo viriones. Las nuevas células B infectadas se pueden transformar, pero son controladas por los linfocitos T citotóxicos (CTL) a menos que la inmunidad esté disminuida.

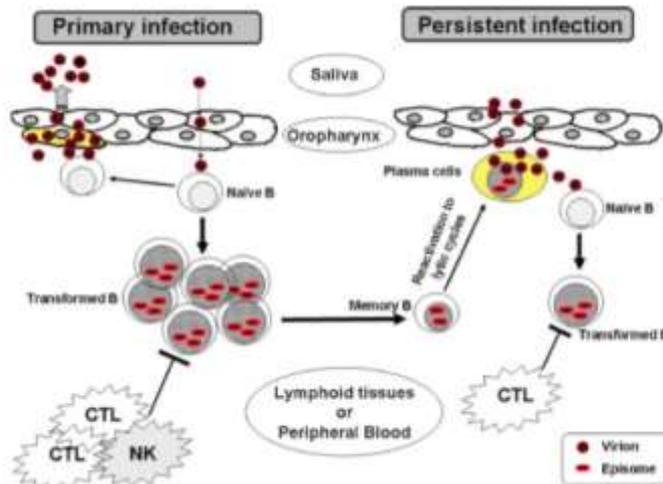


FIGURA 2. CICLO BIOLÓGICO DEL VEB
(REPRODUCIDO CON PERMISO DE KIMURA H, ITO Y, SUZUKI R,
NISHIYAMA Y. MEASURING EPSTEIN-BARR VIRUS LOAD: THE
SIGNIFICANCE AND APPLICATION FOR EACH EBV-ASSOCIATED
DISEASE. REV MED VIROL. 2008;18:305-19)

El VEB, al igual que otros herpes virus, ha desarrollado estrategias para evadir el sistema inmune y establecer una infección latente de por vida.

Durante la fase de latencia la expresión génica del virus está limitada a muchos menos genes, de esta manera el virus disminuye el número de proteínas virales que permiten el reconocimiento de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos. Así, aunque también reconocen antígenos de la fase de latencia, su respuesta es insuficiente para erradicarlos y el virus puede persistir con niveles

bajos o intermitentes de producción de viriones. Durante la fase de latencia puede ocurrir la reactivación del ciclo lítico, probablemente por el estímulo de algunas células B memoria que recirculen por tejidos linfoides y se diferencien en células plasmáticas (9,10).

En un adulto seropositivo para el VEB de 1 a 50 por cada millón de células B quedan infectadas. El genoma del VEB establece una estructura circular o episoma y así permanece latente en estas células. De los casi 100 genes del virus que se expresan durante la fase de replicación sólo 10 se expresan en la fase de latencia. Entre los genes que se expresan en esta fase, se incluyen 6 proteínas nucleares (EBNA 1 a 6), 3 proteínas de membrana (LPM 1, LMP2A y LPM2B), 2 tipos de ARN no codificante (EBERTs 1 y 2) y genes que codifican transcriptasas reversas (BARTs) (2,9,11). Dentro de los ARN no codificantes, se han descubierto fragmentos llamados microARN que juegan un papel importante en ayudar a evadir la respuesta inmune durante la fase de latencia (12).

EBNA-1 es el responsable de mantener el ADN del VEB en estado de episoma en las células infectadas. EBNA-2 parece estar involucrado en la inmortalidad de los linfocitos B. Las proteínas de membrana LMP juegan también papel en el proceso de inmortalidad, LMP-1 parece ser la responsable de la alteración del crecimiento de las células B infectadas, es decir, actuaría como una oncoproteína (10).

Según los antígenos expresados, es posible distinguir 4 tipos de latencia, cada uno de los cuales se ha podido encontrar en determinadas enfermedades asociadas al VEB tal y como explican en el siguiente apartado sobre las enfermedades asociadas al VEB (10,13).

1.1.1 Epidemiología

Aunque han pasado más de cuatro décadas desde el descubrimiento del VEB, todavía no conocemos del todo bien la incidencia de su primoinfección, los factores de riesgo para adquirirla, ni la correlación con la gravedad de los síntomas.

Más del 90% de la población mundial adulta ha presentado una primoinfección por el VEB a lo largo de su vida y tiene marcadores serológicos frente al mismo (14); pero la prevalencia de anticuerpos varía ampliamente según la edad y la localización geográfica.

La seroprevalencia y las edades a las que se produce la primoinfección por el VEB en la población española han sido poco estudiadas. Uno de los estudios realizados en España muestra una distribución bimodal, con un pico entre los 2 y 4 años y otro entre los 14 y 18 años y una seroprevalencia en pacientes mayores de 30 años del 99% (15). Otro estudio realizado en alumnos españoles de entre 13 y 14 años, encuentra una prevalencia de anticuerpos frente al VEB

fue de 73,5%, sin encontrar diferencias significativas respecto al sexo (16).

En otras poblaciones como la asiática ocurre un único pico de primoinfección sobre los 2-3 años, por lo que el 84% de los niños chinos mayores de 9 años tiene evidencia serológica de haber padecido la primoinfección (17).

La edad a la que ocurre la primoinfección por el VEB varía según factores culturales y socioeconómicos. En países en vías de desarrollo y zonas rurales la mayoría de los niños han adquirido la infección por VEB entre los 3 y 6 años de edad. En estos casos, la primoinfección suele cursar de forma silente o con síntomas leves, similares a otras infecciones virales. En cambio, en zonas urbanas y en países desarrollados la primoinfección ocurre en edades más tardías y es más frecuente que produzca más síntomas o que se manifieste como un síndrome mononucleósico (2,14,18).

Cuanto más tarde se adquiere la infección, más probablemente será sintomática, sin embargo, la proporción de infecciones sintomáticas según la edad no ha sido descrita. En un estudio prospectivo realizado en estudiantes universitarios, un 89% de las primoinfecciones fueron sintomáticas (19).

1.2. PRIMOINFECCIÓN POR EL VEB Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

La primoinfección por el VEB puede cursar de forma asintomática, oligosintomática o producir un síndrome mononucleósico completo. Las diferentes manifestaciones y complicaciones van a depender, además de la edad de múltiples factores del propio virus y del sistema inmunitario del huésped e incluso de factores étnicos y genéticos. Parece ser que los síntomas de la MI son debidos a la respuesta de los linfocitos T CD8, más que a la viremia (19). La hipótesis de por qué se producen más síntomas a mayor edad, tendría que ver con el predominio de la respuesta inmune de los linfocitos T CD8 en los adolescentes y con una mayor carga viral en el momento de la transmisión a través de besos y contacto sexual (20). El diagnóstico de la MI se basa en la clínica típica de fiebre, faringoamigdalitis exudativa y linfadenopatía (a veces acompañada de hepatoesplenomegalia), apoyada en los hallazgos de laboratorio típicos (linfocitosis >50%, linfocitos atípicos >10%), confirmándose con pruebas microbiológicas (3)(8).

Aunque el pronóstico es benigno, conviene diagnosticarla rápida y certeramente, pues otras enfermedades como la toxoplasmosis aguda, algunas hepatitis víricas agudas, la primoinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o incluso determinados

procesos linfoproliferativos pueden manifestarse de modo similar (4).

Cuando la primoinfección se presenta de manera oligosintomática, sobre todo en niños más pequeños, la sospecha clínica es más difícil y es importante el papel de las pruebas microbiológicas.

Existen técnicas que detectan una especie particular de anticuerpos heterófilos, cuya aparición es común en el transcurso de la enfermedad, y otras que ponen de manifiesto la presencia de anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas del virus.

Los anticuerpos heterófilos que se detectan en la MI causada por VEB tienen un perfil característico: son mayoritariamente IgM y se fijan a antígenos localizados en la membrana de los hematíes de varios mamíferos. Son ya objetivables en la fase aguda de la enfermedad y rara vez persisten más de dos meses. No aparecen en el síndrome mononucleósico de otra etiología. Existen en el mercado una amplia variedad de pruebas para la detección de los mismos. En general, no hay grandes diferencias de sensibilidad y especificidad entre las distintas pruebas disponibles en el mercado. La especificidad está alrededor del 100% aún no detectando anticuerpos específicos. La sensibilidad varía en función del grupo de población estudiado. En niños mayores de 10 años la sensibilidad es del 80-95% dependiendo de la técnica comercial considerada y del estudio consultado. Los

falsos negativos son frecuentes en niños pequeños (50% de sensibilidad entre los 3 y 10 años) y es raro detectarlos antes de los 3 años o si la extracción de la muestra ha sido precoz. Por todo ello, los resultados negativos deben ser confirmados con anticuerpos específicos (4,10).

La serología específica mide la presencia de anticuerpos virales IgG e IgM frente a diferentes antígenos del virus, como los complejos antigénicos de la cápside viral (VCA), el antígeno precoz (EA) y el antígeno nuclear (EBNA). Son la prueba de elección para determinar la infección aguda en un huésped inmunocompetente y monitorizar la progresión de la infección a lo largo del tiempo (10).

1.2.1 Enfermedades asociadas al VEB

La primoinfección sintomática por el VEB o MI suele ser autolimitada y raras veces presenta complicaciones en personas inmunocompetentes. A pesar de ello, una pequeña minoría puede desarrollar enfermedades asociadas, como trastornos linfoproliferativos malignos a expensas de las células B o de las células epiteliales como el carcinoma nasofaríngeo y también trastornos de tipo autoinmune como la esclerosis múltiple, aunque probablemente el VEB no sea el único desencadenante y se trate de

una etiología multifactorial. Casi el 100% de los Linfomas Burkitt endémicos son positivos para el VEB. Durante los 5 años tras haber pasado una MI el riesgo de linfoma Hodking positivo para VEB aumenta hasta 5 veces, y el riesgo de desarrollar esclerosis múltiple se duplica (21). En personas con una inmunodeficiencia congénita o adquirida (infección por VIH o trasplantados) el riesgo de trastornos linfoproliferativos aún es mayor y se correlaciona con el grado de inmunosupresión.

En 1978 se describió por primera vez la infección crónica activa por el VEB (CAVEB), con casos publicados sobre todo en niños de países asiáticos (Japón) (2). Algunos individuos, tras tener una primoinfección o reactivación por el VEB desarrollan síntomas que no se resuelven. En algunos casos estos síntomas son fulminantes y mueren en días o semanas. En otros casos tienen un curso más crónico, con síntomas de mononucleosis infecciosa persistentes o intermitentes, incluyendo fiebre, linfadenopatía persistente, esplenomegalia y hepatitis por VEB. Son pacientes incapaces de controlar la infección por VEB y en los que los linfocitos T, B o NK VEB positivos infiltran los diferentes órganos y tejidos (22).

A fecha de hoy se desconoce la causa exacta de la CAVEB, aunque diversos factores apuntan a que la etiología puede ser genética. Por un lado, la alteración en la actividad de los linfocitos T citotóxicos o en los NK que presentan estos pacientes, sugieren que la

enfermedad podría ocurrir por un trastorno de la inmunidad. Por otro lado, la mayor incidencia en personas asiáticas y en centro y Sudamérica también hace pensar en una predisposición genética de determinadas poblaciones. Se han descrito diferentes mutaciones en estudios de pacientes con CAVEB, y asociación con algún antígeno HLA, pero no se ha encontrado un defecto genético común presente en la mayoría de ellos.

Llama la atención que se trata en principio de individuos inmunocompetentes y sin factores de riesgo, sobre todo niños, en los que el equilibrio virus-huésped se altera. No obstante, no se conocen del todo bien los mecanismos patogénicos y patofisiológicos de la CAVEB (23).

La mayoría de casos de CAVEB han sido publicados en Japón y países asiáticos, siendo muy poco frecuentes en los países occidentales. En las series publicadas en Estados Unidos predomina la CAVEB de linfocitos B, los pacientes tienen un rango de edad de 4 a 51 años con una edad media de 19 años (24). Los síntomas más frecuentes son la linfadenopatía y la esplenomegalia. En cambio, en las series asiáticas, hay una predisposición a la CAVEB de linfocitos T y NK. La edad de debut está entre los 9 meses y los 53 años con una edad media de 11,3 años. Son frecuentes síntomas de fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, rash cutáneo y diarrea.

Okano et al proponen unos criterios diagnósticos para la CAVEB: síntomas “mononucleosis-like” crónicos o recurrentes durante al menos 6 meses, presencia de títulos altos de anticuerpos frente al antígeno de la cápside (VCA), persistencia de antígeno precoz (AP) y títulos bajos de anticuerpos frente al antígeno nuclear (EBNA) junto con la detección de ADN del virus en tejidos y/o sangre periférica, sin poderse explicar la sintomatología por otro proceso crónico (25). Aunque lo más habitual es encontrar títulos elevados de anticuerpos frente al VEB, no siempre es así, por eso niveles normales de anticuerpos no excluyen la CAVEB. Se ha encontrado una ausencia de anticuerpos EBNA 1 hasta en un 20-33% de pacientes con CAVEB (24).

Lo más importante para el diagnóstico es la cuantificación del ADN del VEB en sangre periférica. El ADN libre en plasma procede de la apoptosis de las células infectadas (26). Los pacientes con CAVEB tienen un elevado número de copias de ADN del VEB en sangre, del orden de unas 100 veces las que muestran los pacientes con MI. Aunque hay autores que defienden analizar el ADN VEB en células mononucleares ya que algunos pacientes con CAVEB pueden no tener ADN libre en plasma (27). Por eso, para el diagnóstico es deseable cuantificar el ADN viral en las células mononucleares, y para el seguimiento y el pronóstico la carga viral en plasma nos va a indicar la cantidad de células infectadas que están infiltrando los

tejidos, y nos refleja el daño en los órganos y por tanto el pronóstico (13).

Las alteraciones inmunológicas que se han descrito en la CAVEB son muy heterogéneas, como una disminución de la actividad de los linfocitos NK o una alteración de la ratio CD4/CD8, pero tanto invertido como aumentado (28).

En ausencia de tratamiento los pacientes con CAVEB desarrollan inmunodeficiencias de tipo humoral y celular con infecciones oportunistas, hemofagocitosis, fallo multiorgánico y trastornos linfoproliferativos. Se han probado diferentes tratamientos antivirales, quimioterápicos e inmunomoduladores sin éxito. La única alternativa terapéutica actual es el trasplante de células hematopoyéticas, aunque con una alta tasa de complicaciones (22,26).

Se ha correlacionado la expresión génica de diferentes genes del virus en la fase de latencia con determinadas enfermedades asociadas como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1. TIPOS DE LATENCIA EN ALGUNAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL VEB

PERFIL	GENES REALCIONADOS	ENFERMEDAD
Latencia tipo 0	EBERs, BARTs	Portador sano Linfoma relacionado con SIDA
Latencia tipo 1	EBNA1, LMP2, EBERs, BARTs	Linfoma Burkitt
Latencia tipo 2	EBNA1, LMP1, LMP2, EBERs, BARTs	Linfoma Hodgkin Linfoma nasal NK/T Carcinoma nasofaríngeo Adenocarcinoma gástrico Trastorno proliferativo post-trasplante
Latencia tipo 3	EBNA1, EBNA2, EBNA3s, LMP1,LMP2, EBERs, BARTs	Mononucleosis infecciosa Infección crónica activa por VEB Trastorno linfoproliferativo ligado al X
Tomado de Kimura y Paschale (10,13)		

1.3. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VEB

Ante una infección viral, la respuesta defensiva del huésped ocurre a diferentes niveles. La primera barrera en actuar es la respuesta inmune innata, con un componente celular (células natural killer o NK y células mieloides) y un componente humoral (citocinas). La respuesta inmune adaptativa necesita más tiempo, ya que se desencadena tras la interacción de componentes antigénicos y receptores de las inmunoglobulinas de los linfocitos B, con ayuda de los linfocitos T. También posee un componente celular (linfocitos T y linfocitos B) y un componente humoral (anticuerpos y citocinas).

1.3.1 Respuesta inmune innata

En el caso de la infección por el VEB, estudios observacionales en humanos han demostrado el papel de las células NK durante la respuesta innata frente al virus (19)(29). Determinados perfiles moleculares asociados a la infección por el VEB son los responsables de activar esta respuesta. Dentro de este grupo de moléculas se encuentran ADN viral no metilado, receptores como los TLR (TLR3, TLR9, TLR7), fragmentos de ARN como los EBER y varias citocinas como la interleucina 12. Las células NK previenen la transformación de las células B vía IFN-gamma y destruyen líticamente a las células

infectadas por el VEB que se están replicando (30). Además, parece haber diferencias entre las células NK tonsilares y las células NK en sangre .

Hay estudios que han demostrado tanto una correlación directa como inversa entre las células NK, la gravedad de los síntomas y la carga viral en la MI (19)(29). Utilizando un modelo de ratón, Chijoke et al demostraron que la depleción de las células NK humanas aumentan los síntomas de la MI y promueven la capacidad tumoral de las células infectadas, debido a una pérdida del control de la replicación lítica del VEB (21). Sin embargo, todavía no se conocen bien todas las interacciones ligando-receptor que intervienen en el control de la infección mediado por las células NK.

1.3.2 Respuesta inmune humoral específica. Evolución serológica

Tras la respuesta inmune innata, se pone en marcha la respuesta inmune adaptativa o específica. La cinética de la respuesta de anticuerpos frente a los complejos antigénicos durante la primoinfección por el VEB es característica y ha sido descrita por diferentes autores (11,14,31,32).

Durante la fase aguda de la enfermedad se detectan anticuerpos IgM frente a proteínas de la cápside (VCA) y frente al antígeno precoz (EA-D), aunque éstos no en todos los casos; poco después se produce la seroconversión IgG anti-VCA (la aparición de estos anticuerpos es prácticamente simultánea a la de las IgM anti-VCA).

Los anticuerpos IgM frente al antígeno nuclear EBNA aparecen durante el primer mes tras la infección, pero no son detectables en muchos casos; los anticuerpos IgG anti-EBNA tardan entre 2 y 6 meses en ser detectables, pero una vez lo son permanecen de por vida. La presencia de los anticuerpos IgG EBNA indica una respuesta de seroconversión típica y un estado de portador sano.

Los anticuerpos IgG anti EA-D y las IgM VCA desaparecen en la fase de convalecencia (rara vez persisten más de 6 meses), mientras que las IgG VCA son detectables de por vida. Cuando el virus se reactiva, los niveles séricos de anticuerpos anti-VCA se incrementan notablemente, reaparecen los anticuerpos anti EA-D, pero rara vez lo hacen las IgM anti-VCA.

No obstante, la respuesta serológica presenta una gran variabilidad entre los individuos, y en ocasiones aparecen “perfiles atípicos” difíciles de interpretar. Los anticuerpos IgM anti-VCA no se producen en todos los pacientes con primoinfección y en algunos casos persisten más de los 6 meses que describen las técnicas clásicas.

Además, hay personas que no producen anticuerpos EBNA-1 (“no respondedores”) y/o que los pierden tras haberlos producido por diferentes circunstancias como una inmunosupresión (33).

En la Figura 3 se muestra la evolución de la replicación del VEB y de los anticuerpos específicos frente al VEB medidos por técnicas enzimáticas.

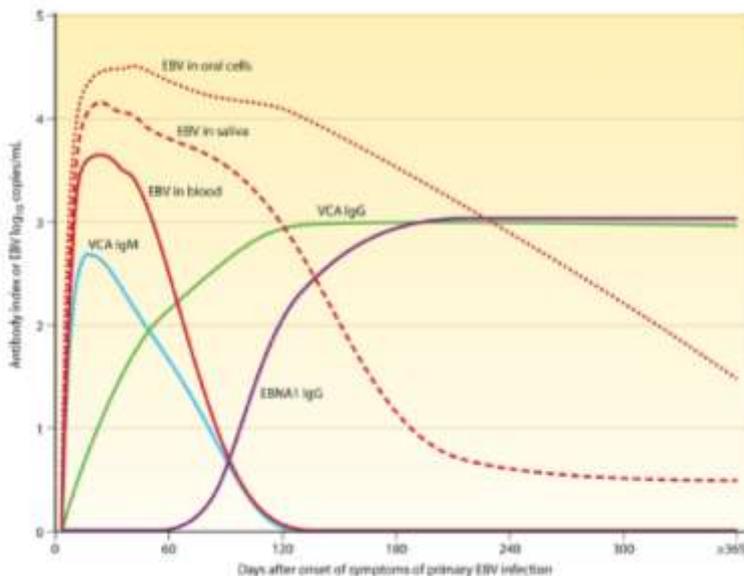


FIGURA 3. CINÉTICA DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y DE LA CARGA VIRAL TRAS LA PRIMOIINFECCIÓN SINTOMÁTICA POR EL VEB. (REPRODUCIDO CON PERMISO DE ODUMADE OA, HOGQUIST KA, BALFOUR HH. PROGRESS AND PROBLEMS IN UNDERSTANDING AND MANAGING PRIMARY EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTIONS. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 2011;24:193-209).

La persistencia de la IgM VCA puede indicar una convalecencia “problemática”, debido a una actividad insuficiente de los linfocitos T CD4 para que se produzca el cambio de clase de las inmunoglobulinas. Normalmente va acompañada de IgG EA(D) persistentemente positivos y un retraso en la aparición de los anticuerpos IgG EBNA1.

La actividad crónica del VEB se caracteriza por la presencia de IgG VCA elevada y niveles de IgG EA(D) persistentemente positivos, con niveles bajos o ausentes de IgG EBNA1 e IgM VCA negativa. Refleja la exposición persistente a los antígenos replicativos del virus y un posible defecto en el aclaramiento de las células B transformadas por parte de los linfocitos T (32).

Según la literatura clásica basada en métodos serológicos de inmunofluorescencia, tras una primoinfección por VEB la IgM VCA desaparece a los 2-4 meses (2,14,31,34). En artículos de revisión más actuales, se sigue describiendo la desaparición de la IgM VCA entre los 3 y 6 meses tras la primoinfección (11), aunque hay otros autores que ya indican que en “raros casos” la IgM VCA puede persistir largo tiempo, incluso cuando ya se han generado los anticuerpos IgG EBNA (33). En la tabla 2 se muestran los datos publicados en revisiones bibliográficas sobre la evolución serológica tras una primoinfección por el VEB.

TABLA 2. DATOS PUBLICADOS SOBRE LA EVOLUCIÓN SEROLÓGICA TRAS UNA PRIMOEINFECCIÓN POR VEB

AUTOR (AÑO)	TIPO DE PUBLICACION	LUGAR	DATOS SOBRE LA SEROLOGIA
Sumaya (1986)(31)	Revisión bibliográfica	Universidad de Texas	IgM VCA (IFA) es negativa a los 1-2 meses
Schuster and Kreth (1992)(34)	Revisión bibliográfica	Alemania	IgM VCA (IFA y ELISA) persiste positiva "varios" meses
Straus (1993)(14)	Revisión (Conferencia)	USA	IgM VCA (IFA) persiste positiva semanas a meses
Hess (2004)(33)	Revisión bibliográfica	Alemania	IgM VCA puede persistir positiva más tiempo en algunos casos No todos los individuos producen IgG EBNA1
Odumade et al. (2011)(11)	Revisión bibliográfica	Universidad de Minnesota	IgM VCA (ELISA) se hace negativa entre 3-6 meses IgG EBNA (ELISA) se hace positivo entre 3-6 meses
De Paschale and Clerici (2012)(10)	Revisión bibliográfica	Italia	IgM VCA puede persistir positiva varios meses

Leach et al. (2014)(2)	Capítulo de libro	Philadelphia	IgM VCA desaparece a los 2-3 meses
---------------------------	-------------------	--------------	--

Hay pocos estudios prospectivos que analicen la evolución serológica tras haber pasado una MI o una primoinfección por VEB. Tal y como se exponen en la tabla 3 la mayoría son en estudiantes universitarios, salvo uno de los primeros realizado en niños por Sumaya et al. (18,35) y en población de EEUU, excepto uno realizado en Edimburgo (36). Los más actuales a partir del año 2000 utilizan técnicas enzimáticas. Los principales resultados se resumen en la tabla 3 dónde podemos ver como se describe la persistencia de la IgM VCA en algunos de ellos (19,37,38) y la ausencia de anticuerpos IgGEBNA(18,19,39–41).

TABLA 3. ESTUDIOS PROSPECTIVOS SOBRE LA PRIMOINFECCIÓN POR EL VEB

AUTOR (AÑO)	LUGAR	N (edad)	TIEMPO DE SEGUIMIENTO	VARIABLES ESTUDIADAS	TÉCNICA	RESULTADOS
Sumaya et al. (1985) (18,35)	Universidad de Texas	113 (6 meses – 16 años)	7 meses	Ac heterófilos IgM VCA IgG VCA IgG EA IgG EBNA Excreción VEB	IFA	-IgM VCA positiva sólo en 1 niño a los 6 meses -IgG EBNA negativos en 14,2%
Fleisher et al. (1985) (39)	Universidad de Pennsylvania	60 (estudiantes universitarios)	6 meses	IgM VCA IgG VCA IgG EA (D) IgG EA (R) IgG EBNA	IFA	-IgM VCA todos negativos a los 6 meses -IgG EBNA negativos en 7 pacientes a los 6 meses
Rea et al. (2001) (37)	Universidad de Washington	150 (>16 años)	6 meses	Leucocitos, GOT, GPT, Bilirrubina, linfocitos atípicos, plaquetas IgM VCA IgG VCA Síntomas, Escala estado funcional	IFA	-corticoides retrasa aparición IgG EBNA y títulos más bajos -IgM VCA persiste positiva en un 13%

Rea et al. (2002)(38)	Universidad de Washington	95 (>16 años)	6 meses a 2 años	IgM VCA IgG VCA IgG EBNA	IFA y ELISA	- IgM VCA persiste positiva más frecuentemente con técnica ELISA
Balfour HH et al. (2005)(42)	Universidad de Minnesota	20 (>16 años)	6 meses	IgM VCA IgG VCA IgG EBNA ADN por PCR en: sangre, células epiteliales de saliva, sobrenadante de saliva, plasma	ELISA	-IgG EBNA persisten negativos más frecuente con ELISA -IgM VCA positiva en 2 pacientes a los 4 meses - 3 patrones de eliminación del VEB: disminución rápida en sangre y linfocitos, no se detecta en plasma, persiste elevado en saliva
Crawford et al. (2006)(36)	Universidad de Edimburgo	241 (>16 años)	4 años			Estudiantes seronegativos 25% desarrollan MI 75% asintomáticos 80% VEB-1 14% VEB-2 6% VEB-1 y VEB-2
Balfour HH et al. (2013)(19)	Universidad de Minnesota	66 (>16 años)	1-2 años	Ac heterófilos IgM VCA IgG VCA IgG EBNA	ELISA	-IgM VCA persistió en algunos sujetos hasta 1 año - IgG EBNA positivos en

					ADN VEB en sangre y saliva Poblaciones linfocitarias Niveles de citocinas en plasma		92% de los pacientes. En 2 sujetos aparecieron después de 1 año
Grimm JM et al. (2016)(40)	Universidad de Minnesota	85 (>16 años)	1 año	Ac heterófilos IgM VCA IgG VCA IgG EBNA ADN VEB sangre y saliva IgG anti-gp350 Niveles GPT	ELISA	-1 paciente no desarrolló IgG VCA -5/14 no desarrollaron IgG EBNA -Duración de la viremia una media de 17 días	
Bu et al. (2016)(41)	Universidad de Minnesota	30 (>16 años)	1 año	Niveles de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes proteínas del VEB (entre ellas EBNA-1)	FACS (sorter cell activated-fluorescens) ELISA	-No encuentran correlación entre los títulos de Ac neutralizantes y la severidad de la primoinfección -Ac frente EBNA-1 y gp350 pueden tardar en aparecer hasta 2 años	

La ausencia de seroconversión (IgG EBNA negativos) puede ser indicativa como ya hemos dicho de una convalecencia “problemática”. Se ha descrito en pacientes con infección crónica por VEB (43). El tratamiento con corticoides también puede retrasar la aparición de los anticuerpos EBNA y títulos más bajos de los mismos (39). Aunque las técnicas de inmunofluorescencia son preferibles a las técnicas enzimáticas, la detección de anticuerpos anti-EBNA puede llevarse a cabo con garantías mediante técnicas de ELISA (p-72-EBNA-1) (4).

Aún hoy seguimos sin conocer del todo la interpretación de algunos perfiles serológicos “atípicos” y su posible repercusión en individuos inmunocompetentes. Las nuevas técnicas de diagnóstico molecular, como la detección de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), podrían ayudarnos en la interpretación de estos perfiles dudosos, aunque aún conocemos pocos datos especialmente en individuos sanos y en población infantil, y harán falta más estudios para estandarizar los niveles de carga viral (10,13,44,45).

1.3.3 Respuesta inmune celular

Aunque nos basamos en la respuesta inmune humoral para el diagnóstico de la infección, la respuesta celular es la más importante

en el control de la primoinfección y en vigilar la reactivación desde su reservorio latente. Así las células natural killer (NK), los linfocitos T CD4 y los linfocitos T citotóxicos CD8 son los encargados de controlar la proliferación de los linfocitos B infectados por el VEB (9). Los lugares de acción y la manera en que estas células efectoras interactúan entre sí aún no se conocen del todo.

Está descrito en la literatura cómo es la respuesta inmune frente al VEB **durante la primoinfección sintomática o Mononucleosis Infecciosa**, en la cual predomina la respuesta de los linfocitos T CD8 y de los linfocitos NK (30,46–49). Los síntomas típicos de este cuadro son probablemente causados por las citocinas que liberan los linfocitos T CD8, más que por el propio virus (48). En algunos estudios se ha encontrado una correlación positiva entre la carga viral en los linfocitos B circulantes, la cantidad de linfocitos T CD8 y también el número de linfocitos NK (19). Aunque otros autores describen una correlación inversa entre la carga viral y el número de linfocitos NK, sugiriendo que la gravedad del cuadro de MI puede ser el resultado de una deficiencia de la respuesta inicial de las células NK (50). Lo que sí se ha descrito es que tras pasar una MI se mantiene una respuesta a la baja de los linfocitos T y NK que dura años, y que no se observa en las primoinfecciones asintomáticas (51).

En pacientes con **primoinfección asintomática**, se han encontrado cifras de carga viral tan elevadas como en la MI, pero sin la expansión de los linfocitos T CD8 (52).

Parece ser, por tanto, que la MI es una enfermedad inmunopatológica. El fallo de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes durante la MI contribuiría al aumento de la carga viral y a la respuesta incontrolada de los linfocitos T CD8 (53).

La respuesta de las células NK predomina y probablemente es más efectiva en combatir las infecciones en edades tempranas de la vida. En cambio, en adultos y adolescentes predominaría la respuesta de los linfocitos T CD8, por eso en pacientes de menor edad es menos frecuente la clínica de MI. La mayoría de los linfocitos T CD8 activados, son específicos frente a antígenos de la fase lítica.

Los linfocitos T CD4 son mucho menores en número en los pacientes con MI, y son específicos frente a antígenos de la fase de latencia. Aunque sean menores en número, la respuesta de los T CD4 es igual de importante a la hora de controlar la infección por el VEB (49), de hecho, como ya hemos comentado en el apartado 1.2.1, una respuesta insuficiente de los linfocitos T CD4 para producir el cambio de clase a inmunoglobulinas G, podría producir la persistencia de los anticuerpos IgM VCA.

Vamos conociendo también algunos aspectos sobre lo que ocurre con la **respuesta inmune durante la fase de latencia o de infección persistente**. Durante esta fase se siguen detectando linfocitos T CD8 específicos para epítomos del ciclo lítico y de las proteínas de latencia, en un rango de entre un 1% a un 4% de los linfocitos T CD8 totales. Esta respuesta parece no ser diferente en individuos que han padecido la primoinfección de manera silente. Se ha visto que la frecuencia de estos linfocitos T CD8 memoria, es mayor que para los linfocitos memoria en otras infecciones como la gripe, pero menor que en otras infecciones de herpesvirus como el Citomegalovirus. Los linfocitos T CD4 son los encargados de regular y “dirigir” la respuesta inmune celular, pero su comportamiento en la infección latente por el VEB está menos estudiado. Si que se han cuantificado una media de entre un 0.34-1.2% de linfocitos T CD4 específicos frente al VEB en portadores sanos del virus, una cantidad mucho más baja de lo referido para los linfocitos T CD8. Estos hallazgos son similares a lo descrito en la respuesta de los linfocitos T CD4 a otros patógenos (47).

Lo que sí conocemos es que la respuesta de los linfocitos T CD8 está fundamentalmente iniciada por contacto directo con las células B infectadas por el virus. En cambio, la respuesta de los linfocitos T CD4 está desencadenada por los antígenos que son secretados y co-

presentados por las células dendríticas o presentadoras de antígeno (48).

En general, la relación de los linfocitos T CD4/CD8 se utiliza como un criterio poco robusto para la determinación de un estado de no adaptabilidad del sistema inmune. Una disminución de esta relación suele aparecer en caso de infecciones virales o por tratamientos inmunosupresores. Un aumento de la relación se puede asociar con enfermedades autoinmunes. En el caso de la primoinfección por el VEB, la dinámica de la respuesta inmune antes explicada, se refleja en una disminución de este índice al aparecer los síntomas de la primoinfección debido al aumento de los CD8, y que se normaliza a partir de los 20-50 días tras el inicio de los síntomas cuando los linfocitos T CD8 entran en apoptosis (54).

Respecto a la **respuesta inmune en la infección crónica (CAVEB)**, todavía se desconocen muchos factores patofisiológicos. En algunos pacientes con CAVEB, se ha descrito una alteración en la respuesta de las células NK o en la actividad de las células T frente a las células infectadas por el VEB, así como una disminución en el número de células T específicas frente al virus (22), aunque los defectos inmunológicos descritos en la literatura son muy heterogéneos, y se ha observado tanto un aumento del ratio CD4/CD8 como una inversión del mismo (28).

1.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EN LA INFECCIÓN POR VEB

1.4.1 Detección de anticuerpos específicos

Las pruebas de anticuerpos específicos utilizan diferentes sustratos o antígenos y distintas técnicas: técnicas de inmunofluorescencia (IF), como inmunofluorescencia indirecta (IFI) o inmunofluorescencia anticomplementémica (IFAC) y técnicas enzimáticas (EIA), como enzimoimmunoensayos (ELISA) y técnicas de quimioluminiscencia (CLIA). Las técnicas de inmunofluorescencia utilizan normalmente células B portadoras de VEB procedentes de pacientes con linfoma de Burkitt. Sin embargo, las técnicas enzimáticas utilizan proteínas recombinantes o nativas purificadas, péptidos sintéticos o proteínas de fusión. En las técnicas de quimioluminiscencia hay un péptido sintético del VEB (fase sólida), con el cual se enlazan los anticuerpos anti-VCA del suero. Durante un segundo paso, se añaden otros anticuerpos marcados con isoluminol que reaccionaran con los complejos antígeno-anticuerpo ya formados. Posteriormente se incorpora un reactivo que induce la reacción de quimioluminiscencia. La señal luminosa que se genera se mide con un fotomultiplicador e indica la concentración de anticuerpos anti-VCA presentes en esa muestra.

Los tipos y preparación de los antígenos utilizados son probablemente los responsables de las diferencias en la sensibilidad

y especificidad de las técnicas (10,33,55). La técnica de CLIA utilizada en nuestro estudio tiene una especificidad diagnóstica del 99% y una sensibilidad de 97% para la detección de la IgM VCA y una especificidad del 96% y una sensibilidad del 98% para la IgG VCA (Liaison®, Diasorin, Italia).

Históricamente el desarrollo de la respuesta de anticuerpos frente a los diferentes antígenos del VEB se ha definido mediante técnicas de Inmunofluorescencia (IF). A pesar de que se han desarrollado nuevas técnicas, enzimáticas y moleculares, se sigue manteniendo la interpretación clásica. Los test comercializados utilizan diferentes marcadores, por lo que no existe una estandarización universal sobre los marcadores serológicos del VEB y su evolución tras la primoinfección.

Aún hoy, las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y anticomplementaria (IFAC) son los procedimientos de referencia o “gold estándar” para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-VCA, anti-EA y anti-EBNA. Pero como con cualquier método de inmunofluorescencia, los problemas inherentes a la técnica como la imposibilidad de automatización y la subjetividad en la lectura, han hecho que la mayoría de laboratorios clínicos con fines asistenciales utilicen las nuevas técnicas enzimáticas comercializadas, que permiten trabajar con un gran número de muestras de manera automatizada (10,56,57).

Además, puede haber falsos positivos por reactividad cruzada con otros epítomos (33), sobre todo por otros virus de la familia herpes, como CMV y también Parvovirus B19, VIH, rubeola y toxoplasma (58) Este hecho dificulta aún más la interpretación de la evolución serológica o de determinados perfiles serológicos tras una primoinfección por VEB.

Como método adicional, disponemos también de los test de avidéz. La avidéz de las IgG anti-VCA nos permite diferenciar entre infección aguda e infección pasada. La avidéz es baja al principio de una infección aguda, pero aumenta conforme la respuesta inmune madura. Se puede medir mediante técnicas enzimáticas, de inmunofluorescencia o de inmunoblotting. Se analizan en paralelo dos alícuotas de la misma muestra que contienen los anticuerpos, una no se trata y la otra se trata con sustancias que disocian los antígenos de los anticuerpos. La disociación va a depender de la avidéz de esos anticuerpos. La ratio entre la muestra tratada y la no tratada define el grado de avidéz (10). La avidéz nos puede ayudar en el diagnóstico, sobre todo en casos con IgM anti-VCA negativos, persistencia de la IgM anti-VCA o anti-EBNA-1 negativos (33).

1.4.2 Técnicas de diagnóstico molecular

La caracterización molecular de los epítomos y antígenos del VEB mediante técnicas de *immunoblotting* o *Western blot*, han contribuido también a entender mejor la respuesta inmune humoral. Nos pueden ayudar a confirmar las técnicas enzimáticas de cribado antes comentadas. Mediante una electroforesis en gel se separan los diferentes antígenos virales, y mediante técnicas habituales de ELISA e IFA se detecta la unión antígeno-anticuerpo. El *immunoblotting* es especialmente útil para distinguir infección aguda o pasada en casos con IgG VCA positiva pero IgG EBNA negativos e IgM VCA negativa, ya que puede detectar antígenos de las IgG que están presentes en pacientes con infección pasada pero no en pacientes con infección aguda (como el antígeno de la cápside p18) (10,32,33). Al igual que las técnicas de inmunofluorescencia y enzimáticas tampoco están estandarizadas, ni disponibles en todos los centros.

En la tabla 4 se resumen las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos diagnósticos disponibles, entre ellos los test de aglutinación para anticuerpos heterófilos y las técnicas de quimioluminiscencia que han sido las empleadas en nuestro estudio.

TABLA 4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DEL VEB

MÉTODO	ANTÍGENO O SUSTRATO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Serología			
IFA	Células como P3HR-1 o Raji	Gold estándar, alta especificidad Permite estadiaje con una sola muestra	Laborioso Requiere personal experto
IFAC	Lisado de células con VEB	Detecta anti-EBNA1	Menos sensible y específico
EIA, ELISA, CLIA	Lisado de células con VEB y/o proteínas recombinantes o péptidos sintéticos	Rápido Alta sensibilidad Automatizado	Sensibilidad según los péptidos utilizados
Western Blot	Lisado de células con VEB y/o proteínas recombinantes	Alta especificidad Método de confirmación 1 sola muestra	No estandarizado
Avidez de las IgG	Titulación de anticuerpos en ausencia y presencia de urea	Confirmación de infección reciente o pasada en casos dudosos	No disponible en todos los laboratorios

Aglutinación de anticuerpos heterófilos	Antígenos de Paul-Bunnell o eritrocitos de cordero, caballo o bovinos	Barato y accesible	Baja sensibilidad y especificidad Sólo en 10-50% de niños < 4 años Falsos positivos en enfermedades autoinmune
Aislamiento del virus	Linfocitos del paciente		Laboratorios especiales 4-8 semanas
Detección de ácidos nucleicos			
PCR	Linfocitos, plasma, suero, LCR, tejidos	Método de elección en inmunosuprimidos Permite cuantificar carga viral	No estandarizado
Hibridación in situ y PCR in situ	Tejido tumoral		
Detección de antígenos virales, inmunohistoquímica e inmunocitología	Tejido tumoral		

Además, las técnicas de diagnóstico molecular también nos permiten detectar el ADN del VEB en tejidos y sangre y cuantificar su

carga viral. Estas técnicas se pueden aplicar en diferentes materiales, pero con diferencias en su sensibilidad y especificidad.

Tal y como se muestran en la tabla 5, cada técnica posee unas ventajas o inconvenientes. Actualmente se emplea la técnica de PCR en tiempo real (59). Este método mide la acumulación de productos de la PCR marcados con una sonda fluorogénica, mediante un scanner láser. No tiene riesgo de contaminación. Es rápido y reproducible, y permite procesar varias muestras a la vez. Por otro lado, necesita un equipamiento específico y todavía caro. La técnica requiere un estándar que se realiza en cada laboratorio individual, por lo que no se deben comparar valores de diferentes laboratorios (13). Esta es la técnica que hemos empleado en nuestro estudio para la detección del ADN viral. En la tabla 5 se muestran los diferentes métodos para medir la carga viral del VEB (13).

TABLA 5. MÉTODOS PARA MEDIR LA CARGA VIRAL DEL VEB

MÉTODOS	DIANA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Hibridación in situ EBER-1	ARN	Sensibilidad Moderada	Sólo aplicable en células, requiere experiencia Lento Difícil
PCR semi-cuantitativa	ADN	Sensibilidad Alta	Cuantificación imprecisa
PCR cuantitativa competitiva	ADN	Sensibilidad Alta	Laboriosa, requiere tiempo
PCR en tiempo real	ADN	Sensibilidad Alta Rápido y reproducible	Necesita equipo especial

Todavía no existe consenso en referencia a qué material utilizar para medir el ADN del virus, qué unidades de medida emplear o qué significación darles a los niveles cuantitativos (10,11,45).

Según la enfermedad asociada al VEB en la que queremos determinar la carga viral, será más adecuado utilizar una muestra u otra. En los trastornos proliferativos post-trasplante, las células B blásticas, proliferan y migran a sangre periférica.

En este caso la mayoría del VEB se encuentra en las células, y detectaremos un alto número de copias de ADN VEB en las células mononucleares. En cambio, en el carcinoma nasofaríngeo, las células malignas proliferan en el propio tejido y el genoma del VEB se libera a sangre periférica, por lo que detectaremos el ADN VEB libre en plasma o suero.

En la primoinfección por VEB, como la mononucleosis infecciosa (MI), el VEB puede encontrarse asociado a las células B en su fase de latencia (células mononucleares), ó libre en sangre periférica (suero o plasma). Cuando nuestro sistema inmune controla la primoinfección, el ADN VEB disminuye rápidamente en el plasma hasta hacerse indetectable en 3 o 4 semanas, aunque puede haber casos en que siga detectándose 1 año (10). También desciende en las células mononucleares, pero no desaparece (fase de latencia). Por ello, para el diagnóstico de la primoinfección es mejor la detección del ADN VEB en suero o plasma.

A la hora de comparar estudios, hay que tener en cuenta también las unidades de medida. Podemos encontrarnos diferentes unidades: copias por mililitro, copias por microgramo de ADN, copias por 100.000 leucocitos o copias por célula positiva para VEB.

Normalmente al ser la MI una enfermedad autolimitada no suele ser necesario la detección del ADN VEB, aunque puede ser útil en casos atípicos o dudosos. Los niveles de carga viral se correlacionan bien con la gravedad de la MI. Se ha descrito una sensibilidad del 80% y una especificidad del 94% para la detección del ADN VEB por PCR en la primoinfección por VEB (44). Además, no se ha detectado el ADN VEB en el suero de portadores sanos sin enfermedad activa por VEB. Sin embargo, sí que puede estar presente en el caso de una reactivación (44). Pacientes inmunocompetentes con infección sintomática por VEB tienen una carga viral de unas 5.000 copias/mL en sangre total durante los 7 a 10 primeros días de la enfermedad. En cambio, en la fase de latencia suelen estar por debajo de 1.000 copias/mL (11).

La detección del ADN VEB sí que es importante para el diagnóstico de personas inmunosuprimidas con una respuesta humoral incompleta, así como en pacientes que han recibido transfusiones o tratamiento con inmunoglobulinas que pueden confundir las pruebas serológicas (10). Además, en el caso de pacientes trasplantados, con riesgo de los temidos trastornos proliferativos, se suele monitorizar la carga viral del VEB de manera cuantitativa en sangre. El problema es que no hay un consenso sobre en qué niveles hay que actuar, y las técnicas difieren según los laboratorios.

Por lo tanto, el manejo no se basa en una determinación aislada, si no en la monitorización en un mismo laboratorio, asumiendo que si aumenta la carga viral hay replicación del virus.

Los pacientes con infección crónica por el VEB también tienen niveles de carga viral mucho más altos que las personas sanas que han pasado la primoinfección.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

- Los datos que conocemos sobre la evolución serológica tras haber pasado una primoinfección por VEB se basan en lo descrito en la literatura “clásica” y en estudios realizados con técnicas de IF (18,35,37,39). En cambio los estudios con técnicas de laboratorio actuales (ELISA) son escasos y la mayoría realizados en estudiantes universitarios y en población no pediátrica (19,36,40,42). Además, con los actuales conocimientos sobre las diferentes variantes del virus, hay autores que sugieren la necesidad de estudiar el genoma del VEB en cada población e incluso en cada patología (6). La evolución serológica podría ser diferente según las técnicas de laboratorio actuales y en niños de nuestra zona geográfica.

- Tanto las diferencias genéticas y raciales, como la edad, juegan un papel importante en la respuesta inmune tras la primoinfección por el VEB. Existen muy pocos estudios publicados sobre las características epidemiológicas y clínicas de la primoinfección por VEB en población infantil. La mayoría de ellos en poblaciones muy distantes a la de nuestro medio como la asiática (17,60), o en población adulta (61). Estas características epidemiológicas y de presentación clínica podrían ser diferentes en población infantil y en nuestra zona geográfica.

- Casi todas las series publicadas son en niños hospitalizados y con clínica de MI (62,63). Conocemos pocos datos sobre las primoinfecciones que cursan de manera oligosintomática como ocurre en niños más pequeños, o con manifestaciones clínicas diferentes a la MI. Las variables epidemiológicas y analíticas, así como la evolución serológica, podrían ser diferentes según el tipo de clínica durante la primoinfección.

- La interpretación de la respuesta serológica tras la primoinfección por VEB en los niños no siempre es tan sencilla como aparece en los manuales “clásicos”. La posibilidad de falsos positivos para la IgM VCA debidos a reacciones cruzadas con otros virus, así como la ausencia de respuesta serológica en algunas personas, nos pone en la situación de tener que interpretar algunos perfiles serológicos atípicos de los que se desconoce su repercusión. Variables epidemiológicas y clínicas podrían influir en la persistencia de la IgM VCA y en la ausencia de IgG EBNA tras la primoinfección.

- En los últimos años, para monitorizar la respuesta serológica tras la primoinfección por VEB utilizamos la IgM VCA y los IgG EBNA. Dado la posibilidad de reacciones cruzadas de la IgM VCA y lo frecuente de las coinfecciones en los niños, podría ser más recomendable utilizar únicamente los IgG EBNA como marcador de seroconversión.

-No se ha descrito en la literatura actual qué probabilidad tenemos de no realizar seroconversión (crear IgG EBNA) tras una primoinfección por el VEB. La probabilidad de que persista la IgM VCA positiva y de que no aparezcan anticuerpos EBNA podría ser más alta de lo esperado. Esta información nos puede ayudar a interpretar los hallazgos en la serología

-Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular y de detección de ADN por PCR, cada vez tenemos más accesibles estas técnicas en nuestros laboratorios. No obstante, todavía estamos en proceso de conocer bien su comportamiento e interpretación en cada enfermedad asociada a la infección por VEB y como actuar cuando detectamos ADN viral. Factores epidemiológicos y clínicos podrían relacionarse con la presencia de ADN viral tras haber pasado una primoinfección por VEB.

- Aunque el VEB es sobre todo peligroso para personas inmunosuprimidas, hay otras enfermedades asociadas al VEB que pueden ser potencialmente graves en individuos inmunocompetentes, como la infección crónica por VEB (CAVEB), y en las que se sospecha que podrían ser debidas a diferencias en la respuesta inmune del huesped. Una evolución serológica “atípica” (persistencia de la IgM VCA y ausencia de seroconversión de los anticuerpos IgG EBNA) tras una primoinfección por VEB en una

persona inmunocompetente, se podría relacionar con una disfunción subclínica a nivel del sistema inmune celular.

Esta información podría contribuir a establecer unas recomendaciones sobre la detección de perfiles serológicos atípicos. Así, en aquellos pacientes en los que persiste la IgM VCA positiva o que no han seroconvertido (IgG EBNA negativo) establecer la conveniencia o no de realizar un seguimiento clínico y serológico en la práctica habitual.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

. . OBJETIVO PRINCIPAL

Describir las características epidemiológicas y clínicas, así como la evolución serológica tras la primoinfección por el VEB en población infantil inmunocompetente.

. . OBJETIVOS SECUNDARIOS

-Conocer las características epidemiológicas y clínicas de la primoinfección por VEB en la población pediátrica de nuestra área geográfica

- Analizar la asociación de diferentes características epidemiológicas (sexo, edad) y analíticas (leucocitos, proteína C reactiva, presencia de anticuerpos heterófilos, coinfección) con el tipo de clínica presentada durante la primoinfección.

- Identificar los factores epidemiológicos y clínicos que se relacionan con la ausencia de IgG EBNA.

- Examinar la relación entre las variables epidemiológicas y clínicas y la persistencia de la IgM VCA positiva.
- Evaluar la utilidad/idoneidad de la negativización de la IgM VCA y de la aparición de los IgG EBNA como marcadores de seroconversión, conjuntamente y de manera independiente.
- Calcular la probabilidad de no crear anticuerpos IgG EBNA o de no realizar una seroconversión tras diferentes períodos de tiempo después de la primoinfección.
- Determinar los factores epidemiológicos y clínicos que se asocian a la presencia de ADN viral tras 1 año de la primoinfección.
- Determinar si hay disfunción inmune celular en los casos con ausencia de seroconversión y/o con ADN viral positivo.

PACIENTES Y MÉTODO

4. PACIENTES Y MÉTODO

. . DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio longitudinal, prospectivo, de tipo observacional y descriptivo de una serie de casos.

. . ÁMBITO DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en niños del Departamento de Salud 14 Xàtiva-Ontinyent a los que se les solicitaron pruebas microbiológicas por sospecha de primoinfección por VEB.

La selección de los casos se realizó a través de la base de datos del Servicio de Microbiología del departamento. El laboratorio centraliza la asistencia de una población de 204.623 habitantes (Censo 2013), de los cuales 30.636 son niños.

. . PERÍODO DE ESTUDIO

Se reclutaron los pacientes entre Febrero 2013 y junio de 2014, y se realizó el seguimiento hasta mayo de 2016.

. . . CRITERIOS DE INCLUSIÓN

La población abarcó a todos los niños y niñas de 1 a 15 años a los que se les había solicitado pruebas microbiológicas (anticuerpos heterófilos y serología para el virus Epstein-Barr) desde su centro de atención primaria, servicio de urgencias u hospitalización por sospecha de primoinfección y la IgM VCA había sido positiva o indeterminada.

Se decidió incluir las IgM VCA indeterminadas ya que al tratarse de una técnica cuantitativa pertenecen a un rango en que no son claramente negativas y podría tratarse de una fase precoz en la cual todavía está en aumento la IgM VCA.

. . . CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se consideraron criterios de exclusión ser mayor o igual de 16 años, tener alguna patología crónica de base, estar recibiendo o haber recibido en el último año tratamiento inmunosupresor o corticoides y/o rechazar participar en el estudio.

. . CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Se utilizó la fórmula recomendada para el cálculo de poblaciones finitas. El tamaño de la muestra, para una precisión del 3%, un nivel de confianza del 95% y una prevalencia media esperada de ausencia de seroconversión de un 2%, fue de 84 pacientes. En nuestro estudio se tuvo en cuenta un porcentaje adicional de pacientes para compensar las pérdidas, que estimamos en un 15%. Finalmente se utilizó como muestra definitiva 103 pacientes.

. . MUESTREO

Se reclutaron los niños con IgM VCA positiva o indeterminada en los sueros de los últimos 6 meses de manera consecutiva desde Febrero de 2013, hasta conseguir una cohorte con el tamaño muestral deseado $n=103$.

. . VARIABLES

Las relativas al momento de la primoinfección se recogieron a partir de la historia clínica electrónica.

Las variables durante el seguimiento posterior de los casos, se recogieron a partir de la anamnesis y exploración clínica realizadas

por el investigador principal y alguno de los 2 pediatras colaboradores.

Los datos analíticos se obtuvieron a través de la extracción de sangre por parte del personal de enfermería durante las visitas de seguimiento, y su posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología de nuestro centro.

4.8.1 Datos sociodemográficos:

-Nº de identificación: variable nominal de tipo numérico

-Sexo: variable dicotómica Varón/Mujer

-Edad: variable numérica expresada en años

-Fecha de la primoinfección: variable nominal expresada como mes del año

-Nivel asistencial de procedencia: variable nominal con los siguientes valores: Urgencias, Sala de Hospitalización de Pediatría o Atención Primaria.

4.8.2 Datos clínicos

-Síntomas y signos: variables nominales

- Fiebre, temperatura igual o > a 38°C axilar: Si/No
- Amigdalitis exudativa: Si/No
- Astenia: Si/No
- Exantema: Si/No
- Adenopatías laterocervicales > 1 cm de diámetro, uni o bilaterales: Si/No
- Esplenomegalia, bazo palpable > de 2 cm bajo reborde costal: Si/No
- Otros. 1 o más de: vómitos, diarrea, dolor abdominal, ictericia, hepatomegalia (hígado palpable > 2 cm bajo reborde costal), miositis, edema palpebral: Si/No
- Presencia de alguna manifestación clínica compatible con infección crónica por VEB (astenia, fiebre) a los 6, 12 ,18 y 24 meses: variable nominal Si/No
- Alteraciones en la exploración física (adenopatías > 1 cm de diámetro, esplenomegalia >2 cm bajo el reborde costal,

hepatomegalia >2 cm bajo reborde costal) a los 6, 12, 18, 24 meses: variable nominal Si/No

-Tipo de clínica: Variable nominal codificada como Típica/ No típica

Clínica típica (síndrome mononucleósico) aquellos pacientes con al menos 2 de los siguientes síntomas: fiebre, faringoamigdalitis, adenopatías y astenia; Clínica no típica u oligosintomática con menos de 2 síntomas de los referidos.

-Tratamiento antibiótico: variable nominal, Si/No

-Necesidad de ingreso: variable nominal, Si/No

4.8.3 Datos analíticos:

-Leucocitos: variable cuantitativa ($\times 10^9/L$)

-Plaquetas: variable cuantitativa ($\times 10^9/L$)

-Proteína C reactiva: variable cuantitativa, expresada en mg/L

-Aspartato aminotransferasa (GOT): variable cuantitativa expresada en UI/mL

-Alanina aminotransferasa (GPT): variable cuantitativa expresada en UI/mL

-Hipertransaminasemia: variable dicotómica Si/No

Se consideró hipertransaminasemia la elevación por encima de 2 veces el valor normal de nuestro laboratorio.

4.8.4 Datos microbiológicos:

Se han tenido en cuenta las recomendaciones STROBE-ID para la publicación de estudios de enfermedades infecciosas y epidemiología molecular (64,65).

-**Anticuerpos heterófilos:** variable nominal dicotómica, Positivos/Negativos

Se analizaron mediante el test rápido de aglutinación de látex Monogen® (Biokit, Barcelona). El reactivo es una suspensión de partículas de látex de tamaño uniforme sobre las que se ha absorbido el antígeno Paul-Bunnell de eritrocitos bovinos, altamente purificado, por lo que sólo reacciona con anticuerpos heterófilos de la MI por VEB. Las partículas de látex ponen de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo. Si hay anticuerpos heterófilos de MI tiene lugar dicha reacción y la suspensión de látex pierde su aspecto uniforme

haciéndose evidente una clara aglutinación. Es un test cualitativo, si la reacción es positiva se observan agregados grandes sobre un fondo transparente (3+), agregados moderados sobre fondo ligeramente opaco (2+) o agregados finos sobre fondo opaco (1+). En las reacciones negativas no hay aglutinación y la suspensión es uniforme.

-IgM VCA: variable nominal

Durante la primoinfección: Positiva/Indeterminada

A los 6, 12, 18 y 24 meses: Positiva/Indeterminada/Negativa

La determinación de la IgM VCA en suero, se analizó mediante una técnica enzimática de quimioluminiscencia indirecta (CLIA) comercializada por Liaison® (Diasorin, Italia). Es un ensayo indirecto, basado en el principio de la quimioluminiscencia. El péptico sintético p18 es el componente principal que se emplea para recubrir las partículas magnéticas (fase sólida) y se añade un anticuerpo monoclonal de ratón que está enlazado a un derivado de isoluminol. Durante la primera incubación, los anticuerpos anti-VCA presentes enlazan la fase sólida. Durante la segunda incubación, el anticuerpo de ratón conjugado reacciona con la IgM VCA ya enlazada en la fase sólida. Después de cada incubación se elimina el material no enlazado mediante un ciclo de lavado. A continuación, se añaden los reactivos que inducen la reacción de quimioluminiscencia. La señal

luminosa, y por tanto la cantidad de conjugado anticuerpo-isoluminol, se mide con un fotomultiplicador en unidades relativas de luz, e indica la concentración de IgM VCA presente. Además, se utiliza un tampón que contiene IgG de cabra anti-IgG humana, para reducir las interferencias debidas a las IgG VCA VEB y al factor reumatoide. Es una técnica cuantitativa que calcula automáticamente la concentración de IgM anti-VEB expresadas en U/mL. Por debajo de 20 U/mL se clasifican como negativo. Las concentraciones entre 20-40 U/mL se clasifican como dudosa o indeterminadas (fase precoz o fase aguda). La muestra con concentraciones iguales o por encima de 40 U/mL se clasifican como positivas.

-Coinfección: variable nominal Si/No

Se definió coinfección al hallazgo de una IgM positiva para otros virus, en el caso de que se hubiera solicitado. También se analizaron mediante técnica enzimática de quimioluminiscencia (CLIA) comercializada por Liason® (Diasorin, Italia).

-IgG VCA: variable nominal

A los 12,18 y 24 meses: Positiva/Negativa

La determinación de IgG VCA VEB en suero se analizó también mediante la misma técnica cuantitativa de CLIA de Liaison® (Diasorin,

Italia). El proceso de la técnica es el mismo que el explicado para la determinación de la IgM VCA. Las muestras con concentraciones de IgG anti-VCA < 20 U/mL se clasifican negativas, y con valores iguales o superiores a 20 U/mL se clasifican positivas.

-IgG EBNA: variable nominal.

A los 6, 12, 18, 24 meses: Positiva/Negativa

Para la determinación de IgG EBNA en suero se utilizó la misma técnica enzimática de CLIA de Liaison® (Diasorin, Italia) explicada para la IgM VCA y los IgG VCA.

-IgG AP: variable nominal.

A los 12, 18 y 24 meses: Positiva/Indeterminada/Negativa.

La determinación del antígeno precoz (IgG AP) se realizó en un laboratorio externo mediante el método ELISA de enzimoimmunoanálisis Vircell® (Granada, España).

-ADN del VEB: variable nominal.

A los 12,18 y 24 meses: Positiva/Negativa.

La detección del ADN del VEB en plasma se realizó en un laboratorio externo por no disponer de esta técnica en nuestro laboratorio. Se utilizó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa con amplificación en tiempo real (gen BALF5). En caso de requerirse cuantificación, las muestras fueron coamplificadas con patrones de carga conocida y la señal obtenida se convierte en carga por interpolación mediante un ajuste de mínimos cuadrados.

4.8.5 Datos sobre la función inmune

- Poblaciones linfocitarias (incluyendo todas: CD3, CD4,CD8,CD19,NK) a los 18 y 24 meses. Variable nominal dicotómica

Normales: cuando todas estaban dentro del rango

Alteradas: cuando alguna de las subpoblaciones estaba por encima o por debajo del rango de referencia.

- Para expresar la alteración de cada una de las subpoblaciones linfocitarias a los 18 y 24 meses se codificaron sus valores como una variable nominal con las siguientes categorías:

Aumentados (por encima del percentil 95 para su edad)

Disminuidos (por debajo del percentil 5 para su edad)

- Ratio CD4/CD8 a los 18 y 24 meses:

Aumentada (por encima del percentil 95 para su edad).

Disminuida (por debajo del percentil 5 para su edad).

La determinación de las subpoblaciones linfocitarias se analizó también en un laboratorio externo, mediante citometría de flujo. Para la interpretación de los resultados se tuvieron en cuenta los valores absolutos y los rangos de referencia publicados para las diferentes edades en niños, expresados como mediana y percentil 5 y 95, tanto de las diferentes subpoblaciones linfocitarias como de la ratio CD4/CD8 (68).

. . PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Tras obtener desde el laboratorio de Microbiología el listado de casos con IgM VC positiva o indeterminada de los últimos 6 meses, se contactó con ellos telefónicamente explicándoles en qué consistía el estudio. Aquellos que quisieron participar en el estudio se concertó una cita en el Hospital de día del servicio de Pediatría. En esa cita se volvió a explicar la finalidad y voluntariedad del estudio, a través de una hoja informativa y los padres o tutores legales firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio. Los

pacientes mayores de 12 años firmaron también el consentimiento informado.

Una vez aceptaron participar en el estudio, se realizó una recogida de datos epidemiológicos y clínicos sobre la primoinfección mediante la revisión de la historia clínica informatizada, completando los datos en el caso que hizo falta de manera retrospectiva en la primera visita.

Se realizó un seguimiento de los pacientes con recogida de datos clínicos y analíticos a los 6, 12, 18 y 24 meses tras la primoinfección según la evolución serológica de cada uno.

El seguimiento tuvo lugar en el Hospital de Día de Pediatría por parte de los pediatras encargados (investigador principal y dos co-investigadores) y del equipo de enfermería de pediatría. Dicho equipo realizaba extracciones a niños de todas las edades a diario. Los padres pudieron estar presentes durante la extracción siempre que lo desearan. Se ofreció de antemano a los padres la administración de anestésico tópico (EMLA®) en los lugares de punción, así como métodos ansiolíticos no farmacológicos y de distracción, para minimizar en lo posible la ansiedad y/o dolor durante el procedimiento. Si el paciente tenía otra extracción analítica programada se intentó hacer coincidir ambas extracciones.

- **1er control a los 6 meses:**

Se realizó una anamnesis y exploración física sobre todo para detectar presencia de linfadenopatía y hepatoesplenomegalia.

Se extrajo suero para determinación de anticuerpos específicos frente al VEB: IgM VCA e IgG EBNA.

Posteriormente se comunicaron los resultados telefónicamente a los padres y si persistía la IgM positiva/indeterminada y/o había ausencia de seroconversión (IgG EBNA -) se citó para un nuevo control en 6 meses (a los 12 meses de la primo infección). Si por el contrario la IgM VCA era negativa y los IgG EBNA positivos salieron del estudio de seguimiento.

- **2º control a los 12 meses:**

Se recogieron datos clínicos y de exploración física al igual que en el anterior control.

Se extrajo serología completa de VEB (IgM VCA, IgG AP, IgG EBNA) con muestra para determinación de ADN viral en plasma. Se comunicaron los resultados por teléfono. Si había seroconversión (IgG EBNA +) y el ADN era negativo se consideró como una respuesta serológica adecuada y se finalizó el seguimiento. Llegado a este punto del seguimiento tras la primoinfección, se dio más importancia a la ausencia de anticuerpos EBNA que a la persistencia de la IgM

VCA, ya que a veces podía tratarse de falsos positivos por reacción cruzada con otros virus. Por ello, se dejaron de seguir a los casos con IgM VCA positiva o indeterminada siempre que no presentaran ninguna clínica y que tuvieran IgG EBNA positivos.

En el resto de los casos (IgG EBNA – y/o ADN-VEB positivo), se citaron telefónicamente para un nuevo control.

-3er control a los 18 meses:

Se recogieron datos clínicos y de exploración física al igual que en el anterior control.

Se extrajo serología completa de VEB (IgM VCA, IgG AP, IgG EBNA) con muestra para determinación de ADN viral en plasma, añadiendo análisis de subpoblaciones linfocitarias. Los casos que a los 18 meses tuvieron ADN viral negativo, poblaciones linfocitarias normales e IgG EBNA todavía negativos, se interpretaron como individuos “no respondedores” y se finalizó el seguimiento.

- 4º control a los 24 meses:

Los casos que a los 18 meses tenían carga viral positiva y/o valores alterados en las poblaciones linfocitarias se realizó un nuevo control a los **24 meses** perpetuando el seguimiento clínico y analítico cada 6 meses si fue necesario.

En la figura 4 se muestra de manera esquemática el diagrama de seguimiento de los pacientes.

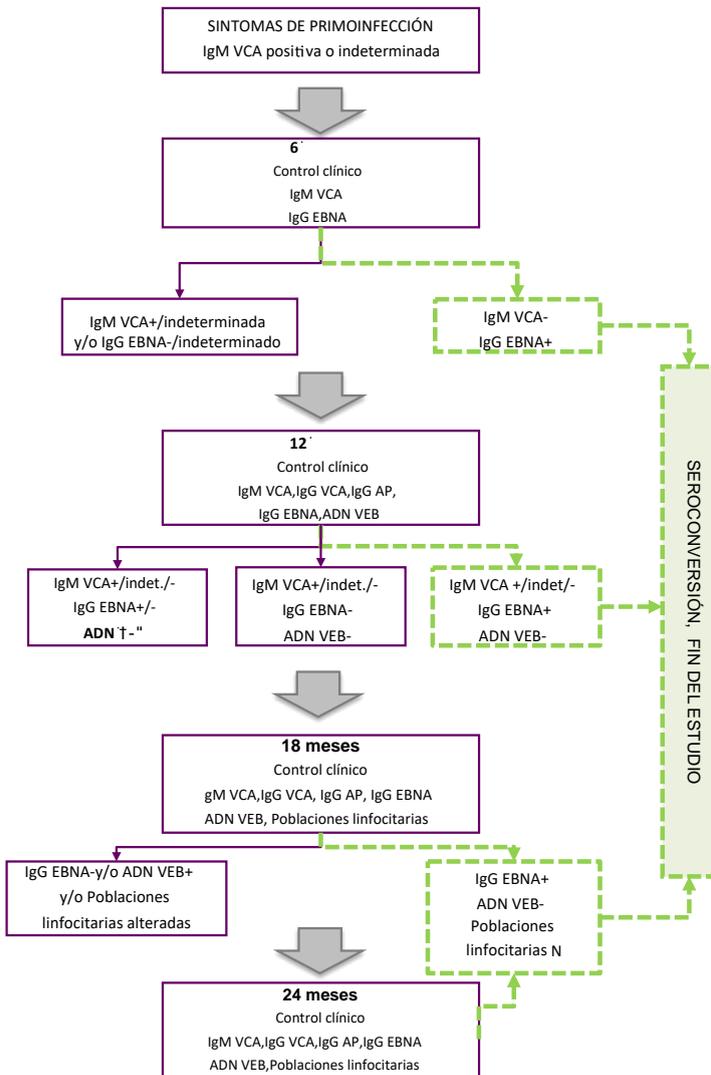


FIGURA 4. DIAGRAMA DE SEGUIMIENTO DURANTE EL ESTUDIO

.1 . DEFINICIONES UTILIZADAS

-Pérdidas: Fueron considerados “Pérdidas” aquellos pacientes que no acudieron a la cita y no se les pudo localizar o decidieron abandonar el estudio.

-Falsos Positivos: Los casos que tuvieron IgG VCA negativa e IgG EBNA negativa, fueron considerados como posibles falsos positivos de la IgM VCA VEB y se excluyeron del análisis.

- Seroconversión: Se consideró seroconversión a los 6 meses a la negativización de la IgM VCA junto con la aparición de los IgG EBNA positivos. A partir de los 12 meses, se consideró seroconversión a la aparición de IgG EBNA positivos independientemente de la IgM VCA.

-Pacientes “no respondedores”: Se definió como pacientes “no respondedores” a aquellos con IgG EBNA negativos a los 12 meses y que persistieron negativos hasta el final del estudio.

-Pacientes “respondedores tardíos”: Se definió como pacientes “respondedores tardíos” a aquellos con IgG EBNA negativos a los 12 meses pero que se hicieron positivos a los 18 meses tras la primoinfección.

.1 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.11.1 Estudio descriptivo

Se realizó un análisis descriptivo de las variables recogidas en el momento de la primoinfección, con el fin de conocer las características sociodemográficas, de presentación clínica y valores analíticos de los sujetos de la muestra. Los resultados para las variables cuantitativas se han expresado como medianas y valores de primer y tercer cuartil. A su vez las variables cualitativas se han expresado como frecuencias y proporciones.

Se realizó también un análisis de las mismas variables en función de si presentaron seroconversión y del tiempo hasta la misma. Este análisis ha incorporado pruebas de asociación bruta (sin ajuste alguno). Se ha empleado el test de Fisher (con simulación Montecarlo del p -valor) en el caso de variables cualitativas. En el caso de las variables cuantitativas se ha empleado la prueba Kruskal-Wallis, debido al incumplimiento de los requisitos del ANOVA (normalidad y homocedasticidad). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el p -valor del test fue \leq a 0.05.

Antes de proceder al análisis estadístico, se comprobó la independencia y concordancia entre los diferentes marcadores de

seroconversión IgG EBNA e IgM VCA en cada período: la independencia mediante el test de Fisher (con simulación Montecarlo del p -valor) y la concordancia mediante la κ no ponderada de Cohen.

4.11.2 Estudio analítico

4.1 . .1. Influencia de las variables en el tiempo hasta la seroconversión

Para determinar la influencia de las variables sobre el estado de seroconversión, y al tratarse de una variable respuesta en forma de tiempo hasta un evento, se planteó un modelo de supervivencia mediante regresión de Cox. No obstante, dado que el diseño del estudio contiene puntos temporales de recogida de información preestablecidos, el abordaje directo mediante un modelo de regresión de Cox al uso, resultó poco práctico y por ello se ha utilizado una variación de la regresión de Poisson (67). Para ello, en primer lugar se seleccionaron variables candidatas a entrar en el modelo, tomando como punto de partida aquellas que en un análisis univariable de supervivencia obtuvieran un valor $p \leq 0.2$, siendo el objetivo perseguido estimar cuáles de estas variables fueron las que se asociaron con el tiempo hasta la seroconversión. Tras ello se

ajustó un modelo empleando todas las covariables seleccionadas, se evaluó su ajuste, y se comparó con modelos que carecían de alguna de ellas o incluían interacciones entre las mismas (la exploración de interacciones probables se hizo mediante el estudio del criterio de información de Akaike –AIC–). Las comparaciones entre modelos se efectuaron de acuerdo a sus log-verosimilitudes, deviances residuales y valores de AIC. Una vez seleccionado un modelo final, se evaluó el cumplimiento del requisito de riesgos proporcionales del modelo de Cox.

Se realizó el análisis teniendo en cuenta uno o varios marcadores serológicos como respuesta de seroconversión:

-La negativización de la IgM VCA junto con la aparición de los anticuerpos EBNA, el ADN viral negativo y las poblaciones linfocitarias normales.

- La aparición de los IgG EBNA positivos, independientemente de lo que ocurra con la IgM VCA y el resto de variables

-La negativización de la IgM VCA, independientemente de los anticuerpos EBNA y del resto de variables.

El modelo estadístico ha tenido en cuenta las pérdidas en cada fase del estudio.

Los que fueron considerados falsos positivos se excluyeron del análisis estadístico.

4.1 . .2. Factores asociados con ADN VEB positivo a los 12 meses

Para evaluar que factores estaban asociados con la presencia de ADN positivo a los 12 meses, se construyó un modelo de regresión logística. Se seleccionaron variables candidatas a entrar en el modelo, tomando como punto de partida aquellas que en una regresión logística univariable obtuvieran un valor $p \leq 0.2$, siendo el objetivo perseguido estimar cuáles de estas variables fueron las que se asociaron con una ADN del virus positivo a los 12 meses. Tras ello se ajustó un modelo empleando todas las covariables seleccionadas, se evaluó su ajuste, y se comparó con modelos que carecían de alguna de ellas o incluían interacciones entre las mismas (la exploración de interacciones probables se hizo mediante el estudio del criterio de información de Akaike –AIC–). Las comparaciones entre modelos se efectuaron de acuerdo a sus log-verosimilitudes, deviances residuales y valores de AIC.

4.1 . .3. Disfunción celular inmune y ausencia de seroconversión

Por último, se evaluó la relación entre disfunción celular inmune y ausencia de seroconversión (ADN e IgM positivos a los 12 meses, o IgG EBNA negativos a los 12 y 18 meses) mediante el test de Fisher (con simulación Montecarlo del p -valor)

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software estadístico R (versión 3.5.2)

.1 . ASPECTOS ÉTICOS

Los datos se trataron de manera confidencial de acuerdo con la Ley 15/1999 del 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. A todos los participantes se les solicitó el consentimiento informado para ser incluidos (ANEXO 1).

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y no hace referencia a ningún dato que pueda identificar a los pacientes incluidos.

El estudio ha sido registrado en la base de datos ENCePP con el código de registro EUPAS 32464.

El protocolo fue aprobado por la Comisión de Investigación del Departamento Xàtiva-Ontinyent y por el Comité de Ética del Hospital Arnau de Vilanova.

.1 . ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistematizada en revistas primarias utilizando la base de datos Medline <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>. Se utilizó el filtro de límite de edad “child”, desde el nacimiento hasta 18 años. No se hicieron restricciones en cuanto a fecha de publicación, lenguaje ni tipo de publicación.

Se utilizaron los siguientes términos MESH combinándolos de diferentes maneras: “Herpes virus 4, human”, “antibodies”, “infection mononucleosis”, “Epstein-barr primary infection”, “Epstein-barr capsid antigen”, “seroepidemiologic studies”, “Epstein-barr virus infection”, “chronic active Epstein-barr virus infection”.

Para acotar la búsqueda se excluyeron aquellos artículos relacionados con patología tumoral o en población inmunosuprimida. También se realizó una búsqueda en la base de datos española IME (Índice Médico Español), así como en la base de datos de tesis doctorales TESEO y Tesis doctorales en red (DART-Europe E-theses Portal).

Mediante la suscripción a un sistema de alerta bibliográfica la búsqueda bibliográfica se fue actualizando durante la realización del estudio.

Se utilizó Mendeley como gestor de la bibliografía.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

. . DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se reclutaron 103 niños y niñas con IgM VCA para el VEB indeterminada o positiva. En todos los casos se había solicitado la confirmación serológica por sospecha clínica de una primoinfección por VEB.

Se excluyeron del análisis 9 pacientes por considerarse falsos positivos para la IgM VCA del VEB, ya que tanto la IgG VCA como la IgG EBNA se mantuvieron negativas durante todo el seguimiento. En el anexo II se describen sus características.

La población de estudio fue de 94 pacientes.

5.1.1 Características sociodemográficas

Un 46% fueron varones y 54% mujeres.

La mediana de la edad fue de 7 años (3-13.8). En cuanto a la distribución por edades, tal y como se muestra en la figura 5 hubo 2 picos de incidencia: a los 2-4 años y en la adolescencia (14-15 años).

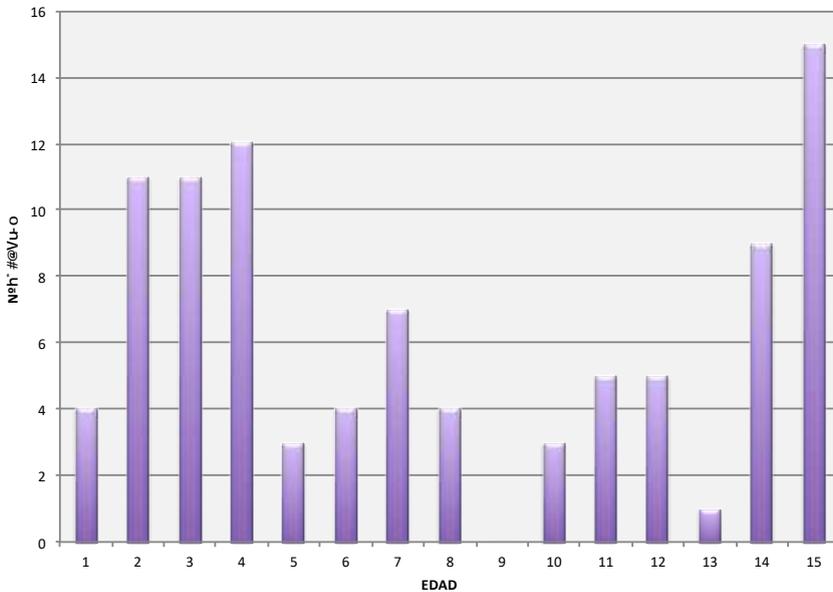


FIGURA 5. DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS SEGÚN LA EDAD EN LA PRIMARIOINFECCIÓN

No hubo una estacionalidad clara a la hora de padecer la primoinfección, aunque hubo mayor número de casos en los meses de abril y octubre tal y como se muestra en la Figura 6.

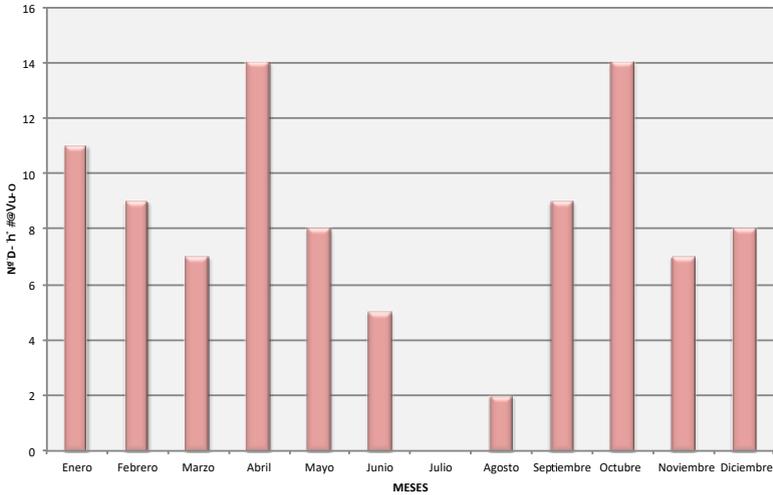


FIGURA 6. ESTACIONALIDAD EN EL MOMENTO DE LA PRIMOINFECCIÓN

La serología se solicitó sobre todo desde el ámbito hospitalario (43% desde el servicio de urgencias hospitalarias y 36% sala de hospitalización de Pediatría y hospital de día de Pediatría). El 21% restante se solicitó desde atención primaria.

5.1.2 Características clínicas

Los signos y síntomas más frecuentes recogidos en la historia clínica fueron: fiebre (68%), adenopatías (62%) y amigdalitis exudativa (60%), el resto se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DURANTE LA PRIMOINFECCIÓN

Manifestaciones más frecuentes	N (%)
Fiebre	64 (68)
Adenopatías	58 (62)
Amigdalitis exudativa	56 (60)
Astenia	22 (23)
Exantema	22 (23)
Esplenomegalia	20 (21)
Manifestaciones menos frecuentes	N
Hepatomegalia	6
Vómitos	7
Dolor abdominal	5
Edema facial	4
Hepatitis	3

Diarrea	3
Tos	3
Miositis	2
Aftas orales	2
Urticaria	1
Ataxia	1
Conjuntivitis	1

Según el tipo de clínica que tuvieron durante la primoinfección, el 68% (n=64) presentó una clínica típica o síndrome mononucleósico y el 32% (n=30) una clínica no típica u oligosintomática.

El 50% (n=47) recibieron tratamiento antibiótico (penicilinas y derivados) en algún momento de la evolución, apareciendo exantema en 18 casos (38%), mientras que sólo apareció en 4 (8.5%) de los que no fueron tratados (p=0,001).

Precisaron ingreso el 16% de los pacientes. Los principales motivos de ingreso fueron la afectación del estado general, la duración de la clínica y la presencia de manifestaciones atípicas como miositis o ataxia.

5.1.3 Datos analíticos

En cuanto a los parámetros analíticos, se realizó hemograma a 82 de los 94 pacientes.

La mediana de leucocitos fue de 10.300/microL (7.05-15.1). Todos presentaron cifra normal de plaquetas, con una mediana de 217.000/microL (184-264).

Se solicitó la proteína C reactiva en 51 pacientes con una mediana de 7.6 mg/L (2.4-22.2). El valor máximo de la proteína C reactiva fue de 121.5 mg/L sin evidencia de sobreinfección bacteriana en los cultivos.

Presentaron hipertransaminasemia el 42% de los casos, con un valor máximo de GOT de 2.236 UI/ml y un valor máximo de GPT de 3.347 UI/ml. Únicamente 3 de estos pacientes tuvieron síntomas de disfunción hepática en el contexto de hepatitis aguda (ictericia, vómitos, dolor abdominal) observando en 2 de ellos coinfección con Virus hepatitis A y Echovirus.

5.1.4 Datos microbiológicos

En 80 pacientes se solicitaron al diagnóstico los anticuerpos heterófilos que fueron positivos en 29 casos (36%).

En lo referente a la serología, en el momento de la primoinfección la IgM VCA fue positiva en la mayoría (78 casos) siendo indeterminada en 16 pacientes. De ellos, 10 casos se manifestaron con una clínica no típica u oligosintomática y 4 tuvieron datos de coinfección.

5.1.5 Datos de coinfección

Se encontraron datos de coinfección con otros agentes infecciosos en 19 pacientes, incluso en algunos casos con más de un virus o microorganismo. Tal y como se expone en la tabla 9, los más frecuentes fueron Citomegalovirus (CMV) y Parvovirus B19.

TABLA 7. COINFECCIONES DETECTADAS DURANTE LA PRIMOINFECCIÓN POR EL VEB

MICROORGANISMO	Nº de casos con coinfección
Citomegalovirus	8
Parvovirus B19	4
Echovirus	3
Coxsackie	2
Influenza A y B	2
Streptococo grupo A	2
Mycoplasma pneumonie	2

Adenovirus	1
Virus Hepatitis A	1
Herpes simple	1

En el anexo III, se describen las características clínicas y serológicas de estos 19 pacientes.

5.1.5.1 Asociación entre las variables y el tipo de clínica en la primoinfección

En la tabla 8 se describen las características de los pacientes según el tipo de clínica durante la primoinfección.

En el grupo de clínica no típica la edad de los pacientes fue menor, con una edad mediana de 5 años (3-8) frente a una de 9 años (4-14) en el grupo de clínica típica, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el grupo de clínica típica (MI) los pacientes recibieron más tratamiento antibiótico con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.015$).

No hubo diferencias significativas para el resto de variables clínicas.

El valor de la proteína C reactiva fue más elevado en el grupo de clínica típica (p 0.022).

No hubo diferencias entre los dos grupos de clínica en el resto de parámetros analíticos: leucocitos, plaquetas, presencia de anticuerpos heterófilos, ni cifras de GOT y GPT.

La IgM VCA indeterminada al diagnóstico fue más frecuente en el grupo con clínica no típica u oligosintomática (p 0.006).

TABLA 8. CARACTERÍSTICAS SEGÚN EL TIPO DE CLÍNICA EN LA PRIMOINFECCIÓN

Variables	Todos N=94	Clínica típica N=64	Clínica No típica N=30	P valor
Edad (años)				
Mediana (Q25;75)	7 (3.0;13.8)	9 (4;14)	5 (3;8)	0.085
Sexo, N(%)				
Masculino	43 (46%)	28 (44%)	15 (50%)	0.730
Femenino	51 (54%)	36 (56%)	15 (50%)	
Antibiótico, N (%)				
Sí	47 (50%)	38 (59%)	9 (30%)	0.015
No	47 (50%)	26 (41%)	21 (70%)	
Ingreso, N (%)				
Sí	15 (16%)	9 (14%)	6 (20%)	0.549
No	79 (84%)	55 (86%)	24 (80%)	
Leucocitos x10⁹/L	N=82	N=58	N=24	
Mediana (Q25;75)	10.3(7;15.1)	10.5 (7;16.2)	10 (8;12.8)	0.732
PCR (mg/L)	N=51	N=39	N=12	
Mediana (Q25;75)	7.6 (2.4;22.2)	10.9 (3.6;26.5)	1.55 (0.6;8.4)	0.022
Plaquetas x10⁹/L	N=80	N=57	N=23	
Mediana (Q25;75)	217 (184;264)	214 (183;251)	248 (197;310)	0.197
GOT (UI/L)	N=79	N=58	N=21	
Mediana (Q25;75)	54 (35;136)	54 (37;121)	61(32;202)	0.926
GPT (UI/L)	N=77	N=58	N=19	
Mediana (Q25;75)	62 (23;196)	62 (30;156)	57 (21;269)	0.794

	N=80	N=57	N=23	
Anticuerpos heterófilos, N (%)				
Negativo	51 (64%)	34 (60%)	17 (74%)	0.345
Positivo	29 (36%)	23 (40%)	6 (26%)	
IgM anti-VCA, N (%)				
Positiva	78 (83%)	58 (91%)	20 (67%)	0.006
Indeterminada	16 (17%)	6 (9%)	10 (33%)	

.2. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA

En la figura 7 y en la tabla 9 se muestra como fue la evolución serológica de la cohorte, y los criterios por los que fueron saliendo del estudio. El tiempo medio de seguimiento fue de 5,9 meses.

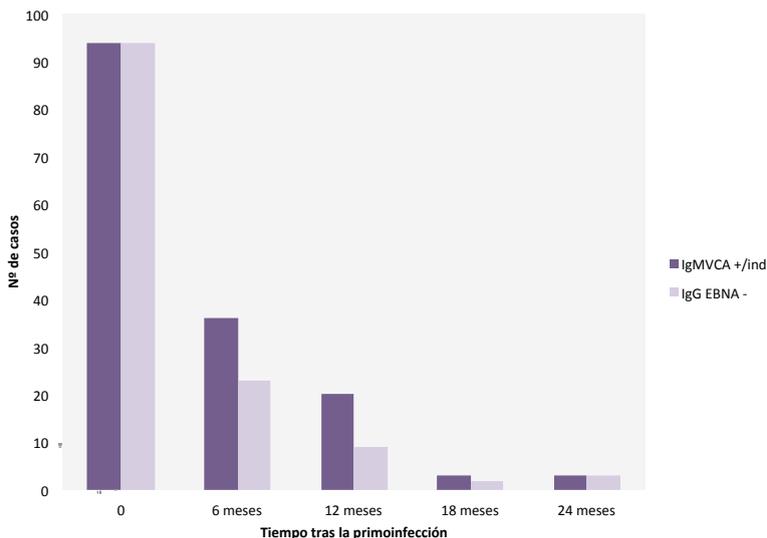


FIGURA 7. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA EN CADA PERÍODO DEL ESTUDIO

TABLA 9. CARACTERÍSTICAS SEROLÓGICAS, VIROLÓGICAS E INMUNES EN CADA PERÍODO DEL ESTUDIO

	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Pérdidas	16	2	2	0
n	78	45	10	8
IgM VCA				
Negativa	42	25	7	5
Indeterminada	18	10	2	1
Positiva	18	10	1	2
IgG EBNA				

Negativa	23	9	2	4
Indeterminada	0	0	0	0
Positiva	55	36	8	4
IgG AP				
Negativo		31	3	4
Indeterminado		2	0	0
Positivo		2	0	0
No consta		10	7	4
ADN VEB				
Positivo		4	0	1
Negativo		41	10	7
Poblaciones linfocitarias				
Normales			4	5
Alteradas			6	3
Salen del estudio	31	33	2	5

Durante el seguimiento de la cohorte se produjo la pérdida de 20 pacientes (21% de la muestra inicial) en diferentes momentos del estudio, tal y como se explica en las figuras 8 y 9. La mayoría (16 sujetos) se perdió en el primer control.

- En el primer control, a los 6 meses, 31 de los 78 niños tuvieron la IgM VCA negativa y los IgG EBNA positivos, por lo que salieron del

estudio. En 36 (46%) persistía la IgM VCA positiva o indeterminada y en 23 (29%) los IgG EBNA todavía eran negativos (figura 8).

- En el segundo control, a los 12 meses, de los 45 analizados 33 (75,3%) salieron del estudio por haber creado anticuerpos EBNA positivos y no detectarse ADN viral en plasma. El ADN viral en plasma fue positivo en 4 casos, en 20 (44%) la IgM VCA persistía positiva o indeterminada y en 9 (20%) los IgG EBNA seguían negativos (figura 8).

- En el tercer control, a los 18 meses, de los 10 analizados 2 niños desarrollaron anticuerpos EBNA positivos y tuvieron el ADN del virus negativo y los valores de las poblaciones linfocitarias normales, por lo que salieron del estudio. Siete niños con alguna alteración en las poblaciones linfocitarias y otro niño con anticuerpos EBNA negativos continuaron en el estudio. La IgM VCA continuaba positiva o indeterminada en 3 (30%) y no habían aparecido anticuerpos EBNA en 2. No se detectó ADN viral en ninguno de los pacientes. Cuatro casos tuvieron alguno de los valores de las poblaciones linfocitarias alterados (figura 8).

- Al control de los 24 meses (figura 9) llegaron 8 sujetos. Los IgG EBNA fueron positivos en 5 casos: 4 se clasificaron como “respondedores tardíos” saliendo del estudio, aunque 1 continuó el seguimiento por presentar una alteración en los NK (caso 7) pero que

no persistió en el siguiente control. Otro sujeto (caso 73), a pesar de no haber desarrollado anticuerpos EBNA, dado que tuvo las poblaciones linfocitarias normales se consideró como “no respondedor” y finalizó también el seguimiento. Sin embargo, los otros dos casos que tampoco habían positivado los anticuerpos EBNA permanecieron en el estudio ya que ambos presentaron poblaciones linfocitarias alteradas y uno de ellos, además, ADN viral positivo en plasma.

En este control la IgM VCA se mantuvo positiva o indeterminada en 3 niños.

- En el control a los 30 meses persistió la seronegatividad para IgG EBNA en los 2 casos por lo que se clasificaron también como “no respondedores”. Uno de ellos mantuvo además la alteración de los linfocitos CD8.

Durante el seguimiento en el estudio (2 años) ninguno de estos pacientes presentó síntomas ni signos compatibles con infección crónica por VEB ni con ninguna complicación.

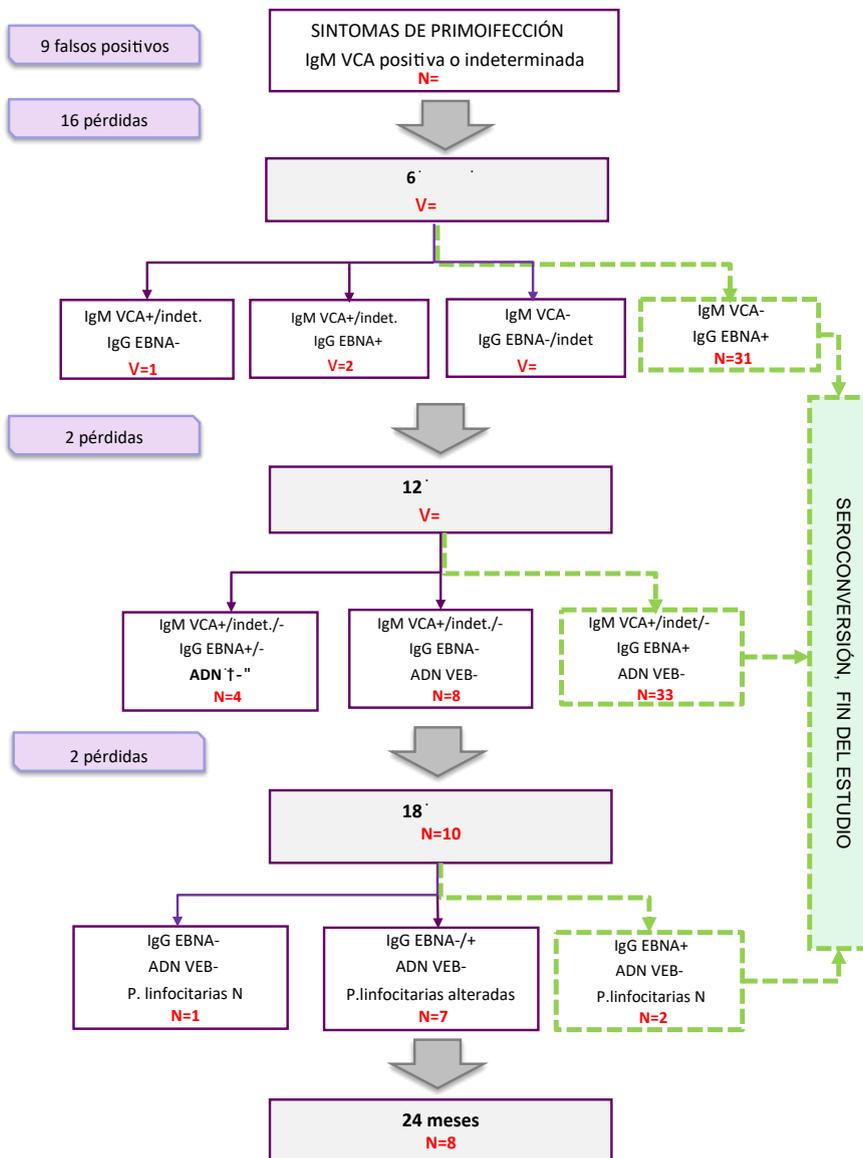


FIGURA 8. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES HASTA LOS 24 MESES TRAS LA PRIMOINFECCIÓN

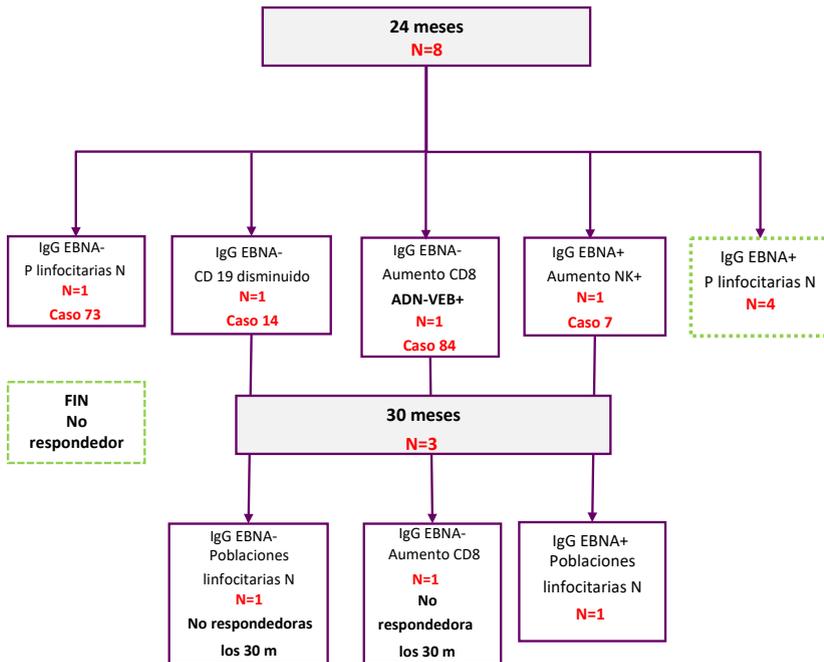


FIGURA 9. SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES A PARTIR DE LOS 24 MESES TRAS LA PRIMOOINFECCIÓN

Respecto a los 4 pacientes en los que se detectó ADN viral en plasma a los 12 meses, ninguno presentó manifestaciones clínicas coincidiendo con la detección del ADN, y en todos la determinación del antígeno precoz (AP) fue negativa (tabla 10). En el control de seguimiento (18 meses tras la primoinfección) ya no se detectó en ninguno de ellos. Sus características clínicas y serológicas se resumen en la tabla 12. Uno de los pacientes (caso 7) se comportó como “respondedor tardío” (positivando IgG EBNA a los 18 meses tras la primoinfección) pero el resto tuvo una respuesta de seroconversión adecuada.

En un 5º paciente (caso 84) la detección del ADN viral fue tardía, en el control de los 24 meses, y coincidiendo con sintomatología de astenia. Tuvo una única determinación de IgG EBNA positivos a los 18 meses, que no se confirmó en los dos controles posteriores, por lo que pudo tratarse de un falso positivo para los IgG EBNA. Se catalogó como “no respondedor” tras 30 meses de seguimiento. No se pudo realizar la cuantificación de la viremia y se perdió el seguimiento del paciente.

Tanto el paciente “respondedor tardío” (caso 7), como el “no respondedor” (caso 84) padecieron la primoinfección con clínica típica.

De los 10 niños que llegaron al control de los 18 meses y se extrajeron poblaciones linfocitarias, en 3 los valores fueron normales y en 7 pacientes estuvo alterada alguna de las subpoblaciones, según los valores absolutos para su edad (66).

De los 8 niños que se siguieron hasta los 24 meses, en 5 las poblaciones linfocitarias fueron normales y en 3 mostraron algún valor fuera del rango para su edad. Las subpoblaciones alteradas en cada paciente se pueden ver en la tabla 16.

TABLA 11. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS ALTERADAS A LOS 18 Y 24 MESES

Caso	18 meses					24 meses						
	CD3	CD4	CD8	CD19	NK	Ratio CD4/CD8	CD3	CD4	CD8	CD19	NK	Ratio CD4/CD8
7	N	N	Aum	N	N	0.96	N	N	N	N	Aum	0.95
14	Aum	Aum	N	N	N	1.74	N	N	N	Dism	N	1.93
17	N	N	N	Dism	N	1.57	N	N	N	N	N	1.37
33	N	N	N	Dism	N	1.9	N	N	N	N	N	1.46
50	N	N	N	Dism	N	1.72	N	N	N	N	N	1.71
51	Dism	N	N	Dism	Dism	2.32	N	N	N	N	N	1.86
84	N	N	Aum	N	N	0.71	N	N	Aum	N	N	0.76

N: normales, Aum: aumentados, Dism: disminuidos

. . INDEPENDENCIA Y CONCORDANCIA ENTRE IGM VCA E IGG EBNA

Se comprobó la independencia y la concordancia entre los marcadores serológicos de seroconversión IgG EBNA e IgM VCA en cada período. Para ello, las IgM VCA indeterminadas se consideraron como positivas.

Para valorar la posible independencia entre ambos (el resultado de los anticuerpos EBNA no depende del valor de la IgM VCA y viceversa) se utilizó, una prueba de Fisher. En cambio, para valorar la concordancia se realizó la prueba κ de Cohen no ponderada, lo que permite ajustar el papel del azar en las coincidencias de ambos marcadores.

Como se expone en la tabla 12, los resultados de la prueba de Fisher no rechazaron la independencia en ninguno de los períodos (todos los valores $p > .05$)

Además, la concordancia entre ambos marcadores fue muy baja (todos los intervalos de confianza del estadístico κ incluían el valor 0), lo que apunta hacia una ausencia de acuerdo entre ambos a la hora de catalogar el estado de seroconversión de un individuo, sin importar el periodo de medición.

Es decir, los resultados apuntaron a que la presencia de la IgM VCA y de los IgG EBNA eran independientes a la hora de valorar el estado de seroconversión.

TABLA 12. ANÁLISIS DE INDEPENDENCIA (TEST DE FISHER) Y CONCORDANCIA (K NO PONDERADA DE COHEN) ENTRE LOS MARCADORES SEROLÓGICOS IGG EBNA E IGM VCA

	EBNA		Valor p	κ (IC 95 %)
	Negativo	Positivo		
<i>6 meses</i>				
IgM				
Negativo	11	31	0.619	-0.07 (-0.27; 0.13)
Positivo	12	24		
<i>12 meses</i>				
IgM				
Negativo	6	19	0.71	0.08 (-0.13; 0.30)
Positivo	3	17		
<i>18 meses</i>				
IgM				
Negativo	2	5	1	0.19 (-0.10; 0.49)
Positivo	0	3		
<i>24 meses</i>				
IgM				
Negativo	3	2	1	0.25 (-0.40; 0.90)
Positivo	1	2		

.4. ASOCIACIÓN DE LAS VARIABLES CON EL ESTADO DE SEROCONVERSIÓN Y EL TIEMPO HASTA LA MISMA

Se realizó un análisis descriptivo univariante para conocer la asociación de las diferentes variables con el estado de seroconversión y el tiempo que transcurrió hasta la misma.

5.4.1 Sexo

Considerando la seroconversión como la negativización de la IgM VCA junto con la aparición de IgG EBNA, las chicas tardaron más tiempo en realizar la seroconversión ($p < 0.003$).

Si tenemos en cuenta sólo la aparición de los anticuerpos EBNA independientemente de la IgM VCA, no se encontró ninguna asociación con el sexo.

En cambio, analizando únicamente la negativización de la IgM VCA, el sexo femenino también se asoció con tardar más en tener la IgM VCA negativa ($p < 0.005$).

5.4.2 Edad

Teniendo en cuenta la respuesta conjunta de la IgM VCA y los anticuerpos EBNA, la edad se asoció con el retraso en realizar la seroconversión, de manera que tardaron más en salir del estudio los pacientes más mayores ($p < 0.010$).

Analizadas las respuestas por separado no se encontró ninguna asociación con la aparición de los anticuerpos EBNA pero si con la IgM VCA, ya que tuvieron más edad los casos en los que persistió la IgM VCA positiva ($p < 0.043$) como se representa en la Figura 10.

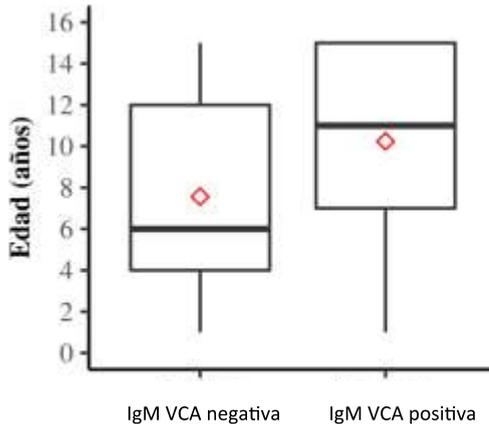


FIGURA 10. DIAGRAMA DE CAJAS PARA LA EDAD SEGÚN LA IGM VCA

Nota: Los rombos rojos indican el valor promedio

5.4.3 Clínica y analítica durante la primoinfección

Considerando la respuesta de la IgM VCA junto con los IgG EBNA, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre cifras más elevadas de GOT (p 0.029) y GPT (p 0.003) en el momento de la primoinfección y más tiempo hasta la seroconversión, como se puede ver en la Figura 11.

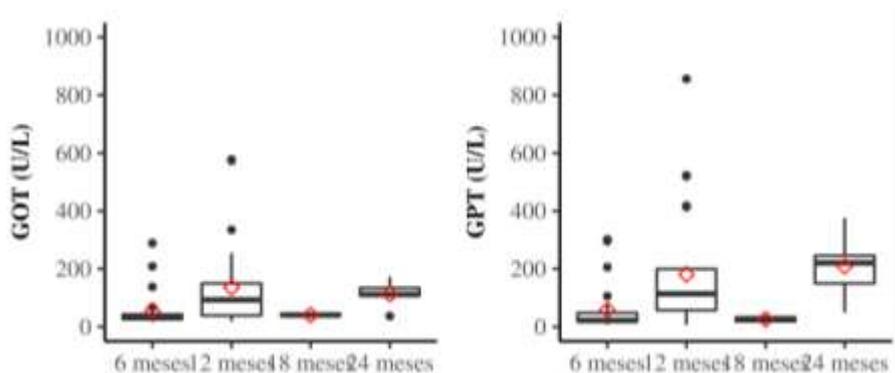


FIGURA 11. DIAGRAMA DE CAJAS PARA LA GOT Y LA GPT SEGÚN EL TIEMPO HASTA SALIR DEL ESTUDIO

Nota: los rombos rojos indican el valor promedio

Teniendo en cuenta sólo la aparición de los anticuerpos EBNA positivos como respuesta de seroconversión, tener una clínica típica en la primoinfección se asoció con más tiempo en desarrollar IgG EBNA positivos (p 0.025)

No encontramos ninguna asociación entre el tipo de clínica ni parámetros analíticos y la persistencia de la IgM VCA positiva.

5.4.4 Presencia de ADN viral

Aplicando un modelo de regresión logística no se encontró ninguna variable que se asociara de manera estadísticamente significativa a la presencia de carga viral positiva para el VEB a los 12 meses tras la primoinfección.

.5. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES SEGÚN EL MODELO DE SUPERVIVENCIA

Se realizó un segundo análisis para conocer la influencia de las variables en el estado de seroconversión. Al tratarse de una variable respuesta en forma de tiempo hasta un evento, se utilizó un modelo de supervivencia. En el modelo se incluyeron las variables seleccionadas según un modelo univariable de supervivencia realizado previamente con todas ellas. (ver métodos)

Según se ha explicado en el apartado de métodos, se realizó el análisis considerando el estado de seroconversión según la IgM VCA

y la IgG EBNA juntas, según sólo la aparición de IgG EBNA, y según sólo la negativización de la IgM VCA.

-Sexo:

Según la respuesta de la IgM VCA junto con los IgG EBNA, coincidiendo con el resultado del análisis descriptivo, el modelo demostró que las mujeres seroconvierten más tarde ($p < 0.001$) ajustado por edad y clínica.

En cambio, el sexo no demostró tener ninguna influencia cuando se analizó por separado la negativización de la IgM VCA y la aparición de los IgG EBNA.

TABLA 13. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA MEDIANTE REGRESIÓN DE COX (TIEMPO HASTA IGM VCA NEGATIVA E IGG EBNA POSITIVOS)

	Riesgo relativo	IC 95 %	Valor p
Sexo			
Femenino	1 (REF.)		
Masculino	2.03	1.30; 3.18	<0.001
Edad	1.03	0.99; 1.08	0.18
Clínica			
Típica	1 (REF.)		
Atípica	1.09	0.69; 1.68	0.70

-Edad:

A diferencia del análisis descriptivo, este modelo no encontró que la variable edad tuviera influencia en el tiempo hasta la seroconversión, ni teniendo en cuenta la respuesta de la IgM VCA junto con los IgG EBNA ni tampoco de manera separada.

-Clínica:

A diferencia también del análisis descriptivo, el modelo no encontró que el tipo de clínica durante la primoinfección tuviera influencia en el tiempo hasta la seroconversión, ni teniendo en cuenta la respuesta de la IgM VCA junto con los IgG EBNA ni tampoco de manera separada.

.6. PROBABILIDAD DE NO REALIZAR SEROCONVERSIÓN

El modelo de supervivencia nos permitió conocer cual es la probabilidad de no realizar la seroconversión tras haber pasado una primoinfección por VEB.

a) Probabilidad de que persista la IgM VCA positiva y no aparezcan IgG EBNA positivos:

La probabilidad de que persistiera la IgM VCA positiva y además no aparecieran anticuerpos EBNA a los 6 meses fue de un 79%, a los 12 meses de 47%, a los 18 meses de 39% y a los 24 meses de 29%.

b) Probabilidad de no crear anticuerpos IgG EBNA:

La probabilidad de no haber creado anticuerpos EBNA a los 6 meses de la primoinfección fue del 49%, a los 12 meses del 27%, a los 18 y a los 24 meses del 12%.

c) Probabilidad de que persista la IgM VCA positiva:

Considerando únicamente la negativización de la IgM VCA , obtuvimos una probabilidad del 36% de que la IgM VCA persistiera positiva a los 6 meses, y del 14% de que continuara positiva a los 12, 18 y 24 meses de la primoinfección.

En la Figura 12 se muestran las **probabilidades de no seroconvertir** en cada período del estudio. En color azul la probabilidad de que persista la IgM VCA positiva y no aparezcan los IgG EBNA. En color

la probabilidad de que persista la IgM VCA positiva sin tener en cuenta el resto de variables.

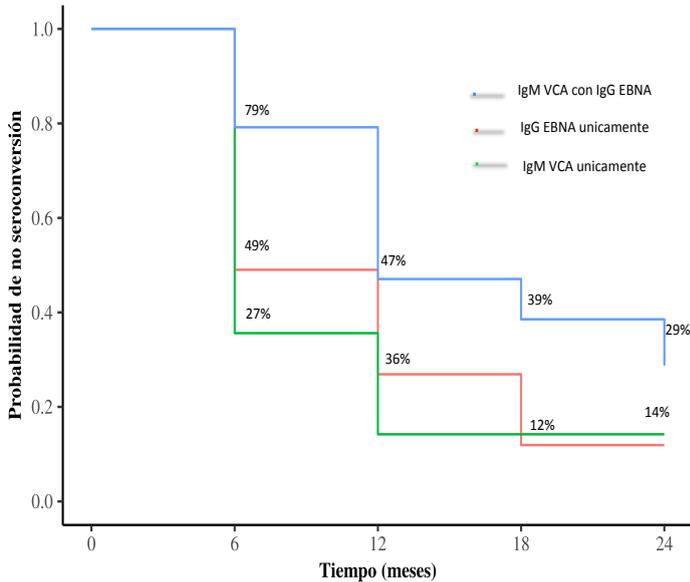


FIGURA 12. PROBABILIDAD DE NO SEROCONVERSIÓN TRAS LA PRIMOFECIÓN POR VEB

La probabilidad de no seroconvertir fue mayor teniendo en cuenta la IgM VCA y la IgG EBNA juntas que si nos fijamos únicamente en los anticuerpos EBNA o en la negativización de la IgM VCA. La

anticuerpos EBNA o en la negativización de la IgM VCA. La probabilidad de que no se desarrollen anticuerpos IgG EBNA fue mayor que la de la persistencia de la IgM VCA positiva.

La probabilidad de que persistiera la IgM VCA positiva fue la misma a los 12, 18 y 24 meses tras la primoinfección, ya que en los casos en los que hubo seguimiento no se modificó el estado de la IgM VCA en los controles de los 18 y 24 meses.

.7. RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN INMUNE CELULAR, AUSENCIA DE SEROCONVERSIÓN Y ADN VIRAL POSITIVO

No hemos encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa entre tener alguna alteración en las poblaciones linfocitarias y que persista la IgM VCA positiva a los 12 meses, así como tampoco con tener los IgG EBNA negativos a los 12 meses y a los 18 meses.

De los 7 pacientes con IgG EBNA negativos a los 12 meses, 5 casos tuvieron algún valor de las poblaciones linfocitarias alteradas en el control de los 18 meses, frente a 2 casos en los que fueron normales. En 3 casos persistieron alteradas en el siguiente control de los 24 meses.

En cambio, hubo 2 pacientes con IgG EBNA positivos a los 12 meses en los que se realizó control de poblaciones linfocitarias, porque tenían ADN VEB positivo. En ellos, como se muestra en la tabla 14, ningún paciente tuvo valores de poblaciones linfocitarias alterados.

En el grupo de pacientes “no respondedores” (EBNA negativos), sí que se observó un mayor número de casos con alteración en las poblaciones linfocitarias, respecto a los que tenían IgG EBNA positivos, aunque sin significación estadística.

TABLA 14. ASOCIACIÓN ENTRE NO SEROCONVERSIÓN (IGG EBNA NEGATIVOS A LOS 12 MESES) Y POBLACIONES LINFOCITARIAS A LOS 18 Y 24 MESES DE LA PRIMOINFECCIÓN

	No seroconversión	Seroconversión	OR	p-valor
	N=7	N=2		
Medida a los 18 meses:				
Poblaciones linfocitarias, N (%)				0.167
Normales	2 (28.6%)	2 (100%)	Ref.	
Alteradas	5 (71.4%)	0 (0.00%)	. [.;.]	
Medida a los 24 meses:				
Poblaciones				1.000

linfocitarias, N (%)			
Normales	3 (50.0%)	2 (100%)	Ref.
Alteradas	3 (50.0%)	0 (0.00%)	. [.;.]

Las alteraciones concretas en las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes “respondedores tardíos” (IgG EBNA positivos a los 18 o 24 meses tras la primoinfección) se muestran en la tabla 15.

Las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes “no respondedores” (IgG EBNA negativos al final del seguimiento) también se pueden ver en la tabla 16.

TABLA 15. DISFUNCIÓN INMUNE EN LOS CASOS “RESPONDEDORES TARDÍOS”

CASO	SEXO	EDAD	ADN 12 meses	ADN	P Linf	CD4/CD8	P linf	CD4/CD8
					18 meses		24 meses	
7	M	1	+	-	CD8 altos	0.96	NK altos	0.95
17	M	14	-	-	CD19 bajos	1.57	N	1.37
50	M	15	-	-	CD19 bajos	1.72	N	1.71
96	V	2	-	-	N	2.04		

M: Mujer, V: Varón, N: normales, P linf: Poblaciones linfocitarias

TABLA 16. DISFUNCIÓN INMUNE EN LOS PACIENTES “NO RESPONDEDORES”

CASO	SEXO	EDAD	ADN	P linf	CD4 /CD8	ADN	P linf	CD4 /CD8
			12 meses	18 meses		24 meses		
14	M	15	-	CD3 altos CD4 altos	1.74	-	CD19 bajos	1.93
73	M	4	-	N	1.87		N	2.21
84	V	2	-	CD8 altos	0.71	+	CD8 altos	0.76

M: Mujer, V: Varón, P linf: Poblaciones linfocitarias, N: normales

De los casos con las poblaciones linfocitarias todavía alteradas en el control de los 24 meses, a los pacientes 7 y 14 se les realizó un nuevo control donde fueron normales. En el paciente 84 continuaron elevados los linfocitos CD8 a los 30 meses tras la primoinfección, pero sin ninguna manifestación clínica y con ADN viral negativo, aunque no se pudo comprobar la evolución de las poblaciones linfocitarias pues no acudieron a nuevos controles.

El cociente CD4/CD8 fue normal en todos los pacientes, salvo en el paciente 84 (no respondedor) que tuvo un ratio CD4/CD8 disminuido para su edad por el aumento de los linfocitos T supresores CD8 (Tabla 16). En el paciente 7 el ratio estuvo en el límite bajo de la normalidad (percentil 5). En estos dos pacientes se detectó viremia

en algún momento del seguimiento, en el caso 7 a los 12 meses y en el caso 84 a los 24 meses tras la primoinfección.

Tampoco hemos encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa entre las poblaciones linfocitarias alteradas y haber tenido ADN viral positivo a los 12 meses, como se muestra en la tabla 17.

TABLA 17. ASOCIACIÓN ENTRE NO SEROCONVERSIÓN (ADN POSITIVO A LOS 12 MESES) Y POBLACIONES LINFOCITARIAS

	No seroconversión N=4	Seroconversión N=6	OR	p-valor
Medida a los 18 meses:				
Poblaciones linfocitarias, N (%)				1.000
Normales	2 (50.0%)	2 (33.3%)	Ref.	
Alteradas	2 (50.0%)	4 (66.7%)	1.8 [0.1;32.2]	
Medida a los 24 meses:				
Poblaciones linfocitarias, N (%)				1.000
Normales	2 (66.7%)	3 (60.0%)	Ref.	
Alteradas	1 (33.3%)	2 (40.0%)	1.3 [0.1;58.0]	

Las alteraciones concretas en las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes con ADN positivo fueron las que se muestran en la tabla 18.

TABLA 18. DISFUNCIÓN INMUNE EN LOS PACIENTES CON ADN VEB POSITIVO

CASO	SEXO	EDAD	ADN VEB	P linf	CD4 /CD8	P linf	CD4 /CD8
				18 meses		24 meses	
7	M	1	+ 12 m	CD8 altos	0.96	NK altos	0.95
30	V	5	+ 12 m	N	1.46		
32	M	7	+ 12 m	N	1.9	N	1.46
51	M	15	+ 12 m	CD3 bajos CD19 bajos NK bajos	2.32	N	1.86
84	V	2	+ 24 m	CD8 altos	0.71	CD8 altos	0.76

M: Mujer, V: Varón, m: meses, P linf: Poblaciones linfocitarias, N: normales

De los pacientes con ADN VEB positivo a los 12 meses de la primoinfección, la mitad (2 casos) tuvo los valores de alguna de las subpoblaciones linfocitarias alteradas a los 18 meses y sólo 1 caso persistieron alteradas a los 24 meses de (caso 7) (ver tabla 18).

La alteración no siguió el mismo patrón, pues en el caso 7 fue un aumento de los linfocitos T supresores CD8 y de las células NK, y en el caso 51 fue una disminución de los linfocitos B (CD19) y de las células NK.

El paciente que presentó ADN VEB positivo a los 24 meses de la primoinfección (caso 84) tuvo las poblaciones linfocitarias alteradas a los 18 meses (CD8 altos) y persistieron alteradas de la misma manera a los 24 meses, sin poder repetirse más adelante ya que se perdió el seguimiento.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

. . . CARACTERÍSTICAS DURANTE LA PRIMOIINFECCIÓN

El análisis descriptivo de esta cohorte de casos ha permitido conocer las características epidemiológicas, clínicas y analíticas de los niños con primoinfección por VEB en un área geográfica.

6.1.1 Características epidemiológicas

La relación varones/mujeres identificada es similar a lo publicado en la literatura donde no hay predilección por ningún sexo (15,19,37,40).

En cuanto a la edad, en nuestra cohorte encontramos una distribución bimodal con dos picos de incidencia de la primoinfección (entre los 2-4 años y en la adolescencia). Estos hallazgos coinciden con lo descrito por otros autores españoles (15,63) y en población Mejicana (62), aunque son estudios en niños hospitalizados y en el primero de ellos se trata de niños y adultos. En cambio, en la literatura nortemaericana se han descrito mayor número de casos en

la adolescencia (14), pero la mayoría de estudios se han realizado en niños con síndrome mononucleósico e ingresados.

En otras poblaciones como la asiática, los niños padecen la primoinfección por el VEB a edades más tempranas, con un único pico de incidencia a los 2-3 años de edad y con una seroprevalencia del 84% en niños mayores de 9 años (17,60). Aunque estas diferencias podrían explicarse por ser la población asiática más rural, también parece que puedan influir factores étnicos y genéticos, al igual que en otras características de la primoinfección.

Estudios más recientes en países desarrollados como EEUU y Francia sugieren que la primoinfección por el VEB se adquiere cada vez más tarde (46,68). En nuestra muestra, en cambio, hasta un 59% de los pacientes diagnosticados serológicamente de primoinfección por VEB fueron menores de 10 años. El objetivo de nuestro estudio no fue obtener datos de seroprevalencia, por lo que este resultado puede estar sesgado debido a que en niños de mayor edad se trata de un cuadro clínico más florido y en muchas ocasiones se realiza un diagnóstico clínico y no se solicita confirmación analítica, que fue el criterio de inclusión en nuestro estudio.

Tuvimos mayor número de casos en octubre y abril, pero no hubo una estacionalidad clara de la primoinfección, tal y como describen otros autores (2,8,69). En otros estudios españoles con población

pediátrica refieren un discreto predominio en primavera (63). Probablemente, el período de mayor número de casos en nuestra muestra coincidió con los meses de guardería y escolarización, en los que hay contacto más estrecho entre los niños y la presencia de coinfecciones por otros virus.

6.1.2 Características clínicas

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en el momento de la primoinfección fueron similares a las descritas en otras series (35,60–63) pero con unos porcentajes diferentes.

Las adenopatías y la fiebre se detectaron en menor proporción mientras que el resto de manifestaciones, como la amigdalitis exudativa, el dolor abdominal, el exantema, el edema palpebral o la ictericia, lo fueron en proporciones similares a lo ya publicado (35,60–63). Probablemente estas diferencias pueden explicarse porque el presente estudio incluye pacientes ambulatorios y hospitalizados mientras que el resto describe solo casos ingresados lo que implica una mayor gravedad o complejidad.

Aunque en consonancia con lo descrito clásicamente se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la aparición de

exantema y la administración de antibiótico, llama la atención que esta no se confirme en otras series (35,63). Quizás la diferente proporción de pacientes tratados con antibiótico en los estudios podría explicarla, aunque es un dato que no aportan.

A pesar de lo esperado, dada la menor edad de los casos incluidos, predominó la clínica típica o MI sobre la no típica. El hecho de que a partir de 2 síntomas se considerase clínica típica, puede haber sobreestimado la presencia de clínica típica o MI en nuestra muestra. No obstante, aunque no obtuvimos una diferencia estadísticamente significativa, la edad mediana de los pacientes con clínica no típica u oligosintomática fue menor que la de los de clínica típica, de acuerdo con lo descrito en la literatura dónde el síndrome mononucleósico es más frecuente en niños más mayores y adolescentes.

Existen pocos estudios prospectivos a partir de personas seronegativas para VEB (tabla 3). Todos ellos se realizaron en estudiantes universitarios, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con datos propiamente pediátricos. Aún así nuestros resultados se parecen más a los de las cohortes de EEUU (19,40), dónde casi un 80% tuvieron un cuadro de MI y el resto clínica no típica (12%) o asintomática (11%). La selección de casos en nuestra cohorte fue a partir de niños sintomáticos, por lo que no pudimos saber el porcentaje de primoinfecciones asintomáticas en

nuestra área geográfica. En cambio, en otro estudio prospectivo realizado en estudiantes de Edimburgo, sólo un 25 % de los estudiantes que pasaron la primoinfección desarrolló MI (36).

6.1.3 Características analíticas

Respecto a los parámetros analíticos en el momento de la primoinfección, son similares a lo descrito en la literatura (35,37,60–62). Se han descrito entre un 5-12% de casos de trombopenia asociada a la primoinfección por VEB (60,62,63,70), similar al 10% de casos con $<150 \times 10^9/\text{mL}$ plaquetas en nuestra muestra, aunque fueron todos casos con trombopenia leve ($> 80 \times 10^9/\text{mL}$ plaquetas).

La prevalencia de hipertransaminasemia entendida como valores de GOT y GPT por encima de 2 veces su valor normal, fue similar a lo encontrado por González Saldaña et al.(62) y Gao et al. (60) y menor de lo descrito por Grotto et al. (61), quizá porque estos últimos eran adultos jóvenes, y si que parece que los casos de hipertransaminasemia son más frecuentes a mayor edad (60).

Algunos autores españoles describen prevalencias más altas, pero consideran como hipertransaminasemia cualquier aumento de GOT y GPT (63,70).

El aumento de transaminasas suele ser asintomático, sólo 3 casos de nuestra serie tuvieron clínica de hepatitis con ictericia, similar también a lo descrito en la literatura, y probablemente en 2 de los casos influyó la coinfección con virus hepatotropos como el Virus de la Hepatitis A y el Echovirus.

Al comparar los valores analíticos entre el grupo de clínica típica y clínica no típica, no encontramos diferencias en los valores de leucocitos, plaquetas, GOT, GPT ni presencia de anticuerpos heterófilos. Únicamente la mediana de la proteína C reactiva fue significativamente mayor en el grupo con clínica típica o MI, lo que parece correlacionarse con el mayor grado de respuesta inflamatoria responsable de la clínica del síndrome mononucleósico.

6.1.4 Datos microbiológicos

El porcentaje de anticuerpos heterófilos (AH) positivos (36%) fue más bajo en ambas formas de presentación clínica respecto a lo descrito en la literatura. Aunque algunos autores encuentran una prevalencia de AH mayor que la nuestra (18) todos coinciden en que esta es menor a menor edad (18,34). La baja producción de anticuerpos heterófilos en nuestros pacientes podría deberse a que un 59% de eran menores de 10 años.

No todas las técnicas para detectar los anticuerpos heterófilos tienen la misma sensibilidad y especificidad (71). El test utilizado en nuestro laboratorio tiene una sensibilidad del 76% y una especificidad del 98% según el fabricante (Monogen® Biokit).

Otros autores describen una prevalencia de AH más parecida a la nuestra (8,63,72), además de encontrar que son frecuentemente negativos en la fase precoz y en la fase tardía de la primoinfección (72). Por lo que otra posible explicación de nuestro resultado es que los AH se hubieran determinado en una fase precoz de la primoinfección, o en una fase tardía, sobre todo en el caso del 22% de serologías que se solicitaron desde atención primaria.

Los casos con IgM anti-VCA indeterminada pueden ser de difícil interpretación. En nuestra muestra hubo una asociación estadísticamente significativa entre tener IgM VCA indeterminada y clínica no típica u oligosintomática. Es importante no descartar el diagnóstico de primoinfección ante una IgM indeterminada ya que podría tratarse de una fase precoz o de un caso oligosintomático. Además, es interesante en los casos de IgM VCA indeterminada descartar coinfección por otros virus herpes y realizar un control posterior para ver la evolución serológica.

6.1.5 Datos de coinfección

En un porcentaje importante de niños se detectaron serologías positivas para otros virus. Aunque existen referencias sobre casos con doble infección por el VEB con el virus herpes 6 y el CMV (73), en algunos casos es difícil interpretar el agente etiológico sólo por las manifestaciones clínicas. Hay descritos casos de falsos positivos para la IgM VCA del VEB durante el curso de otras infecciones, como las causadas por el Citomegalovirus (CMV), el parvovirus B19, toxoplasma gondii, hepatitis A o VIH. El CMV y el VEB comparten el epítipo glicina-alanina, responsable de la reacción cruzada en las respuestas de anticuerpos que generan. También se han observado reacciones cruzadas o una respuesta policlonal de IgM en los casos de infección por parvovirus B19 (74) y en casos en los que hay presentes autoanticuerpos y/o factor reumatoide (10). En el estudio piloto que se realizó para evaluar el test de CLIA Architect® (Abbott, Alemania) , también encontraron un 60% de reactividad cruzada con CMV y un 31% con Parvovirus B19 (58).

Por otro lado, los anticuerpos IgM del paciente pueden reaccionar contra la fase sólida de los test de quimioluminiscencia Liaison® (como el utilizado en este estudio) y dar falsos positivos (75), por lo que a la hora de interpretar los resultados siempre hay que correlacionarlo con la clínica.

En la fecha en la que se inició este estudio, nuestro laboratorio sólo realizaba la determinación de la IgM VCA VEB y la IgG VCA VEB en los sueros de pacientes con sospecha de mononucleosis, por lo que al utilizar como criterio de inclusión únicamente la IgM VCA se han podido incluir falsos positivos. En los últimos años se han desarrollado test comerciales para el diagnóstico serológico de la infección por VEB, basados en la determinación simultánea de la IgM VCA, la IgG VCA y los IgG EBNA en el mismo suero (56–58). Han demostrado ser coste-efectivos a la hora de diagnosticar y dar información de la fase de la infección en la que nos encontramos. Actualmente en nuestro laboratorio también se han incorporado estos test y se realiza la determinación simultánea de la IgM VCA, IgG VCA e IgG EBNA, con lo que es más fácil interpretar los resultados serológicos y sospechar los falsos positivos.

En cuanto al comportamiento clínico de estas coinfecciones, se han publicado casos de serologías doblemente positivas para VEB y CMV con una evolución más prolongada y complicada (63). En nuestro país se han descrito dos casos de trombopenia grave con sospecha de coinfección por Herpes 6 y CMV (76). En cambio, en otras series la evolución clínica no ha sido más grave (70), pero en la mayoría de los casos los autores no han podido confirmar la coinfección, como ha ocurrido en nuestra muestra. En uno de los estudios en que aplicaron técnicas de avidéz de los IgG, concluyeron que en la mayoría de los

casos no se trataba de coinfecciones, si no más bien de infecciones pasadas (77).

Por lo tanto, en nuestros pacientes, sólo realizando otras pruebas como la avidéz de las IgG o la detección del ADN mediante técnicas de PCR (no disponibles en nuestro laboratorio) hubiera sido posible confirmar si se trataba de una coinfección o de una reacción cruzada.

.2. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA TRAS LA PRIMOIINFECCIÓN

6.2.1 IgM VCA

Durante el seguimiento de la cohorte de casos encontramos que la IgM VCA persistía positiva más tiempo de lo esperado. Este hallazgo contrasta con lo publicado en la literatura clásica, donde siempre se ha descrito la negativización de la IgM VCA a los 6 meses de la primoinfección (2,14,18,34).

Los métodos enzimáticos de ELISA detectan más frecuentemente la IgM VCA positiva que los métodos de inmunofluorescencia (38), lo que pudo influir también en nuestra cohorte.

Otros autores más recientes ya describen la posibilidad de que la IgM VCA puede persistir positiva más tiempo (10,19). Ninguno de

ellos correlaciona este hallazgo con la presencia de manifestaciones clínicas ni con la presencia o no de anticuerpos EBNA.

En la mayoría de infecciones víricas, las inmunoglobulinas de clase IgM se producen en cantidades detectables durante la fase aguda y la convalecencia temprana de la infección. En otros virus herpes, como la infección por el virus Varicela Zoster, los anticuerpos IgM son detectables a los 3 días tras la aparición de los síntomas y descienden en unos pocos meses (78). En algunos casos, como en la infección por el virus de la hepatitis A, se ha descrito la detección de anticuerpos IgM en fases más tardías, pero esto puede ser debido al nivel de corte determinado por el test de laboratorio empleado (79). No está descrito en la literatura la persistencia de anticuerpos IgM más allá de la fase temprana de convalecencia ni su posible significado patológico en individuos inmunocompetentes.

6.2.2 IgG EBNA

En nuestra muestra pudimos observar un retraso en la aparición de los anticuerpos IgG EBNA respecto a lo descrito clásicamente. Algunos autores posteriores, han descrito que no todas las personas producen anticuerpos IgG EBNA-1, y que se pueden perder en determinadas situaciones como la inmunosupresión (10,33).

En los primeros estudios prospectivos en los años 80 realizados con técnicas de inmunofluorescencia, ya detectaron que en un 14% de los pacientes los IgG EBNA persistían negativos a los 7 meses (18), y que en los pacientes con MI tratados con corticoides se retrasaba la aparición de los EBNA y tenían títulos más bajos (39). Al igual que pasaba con los anticuerpos IgM VCA, los anticuerpos IgG EBNA eran más frecuentemente negativos cuando se utilizaban técnicas enzimáticas como ELISA (38). En estudios prospectivos posteriores también confirmaron la existencia de casos en los que no aparecen los IgG EBNA hasta 2 años después de la primoinfección (19,40,41). En población asiática encontraron un porcentaje de anticuerpos EBNA negativos a los 6 meses (20%) similar al nuestro (80).

Esta variación en los títulos y en la aparición de los EBNA-1 entre individuos, parece ser debida a una variación en la permeabilidad de las células B al VEB o a diferencias en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Rubicz et al. encontraron una relación estadísticamente significativa entre factores genéticos de la región HLA II y los niveles de anticuerpos EBNA-1. En cambio, no encontraron esta asociación para otros patógenos evaluados en su estudio (81).

Aquellos individuos que desarrollan síntomas de infección crónica por VEB no tienen anticuerpos anti-EBNA-1 o a títulos muy bajos, causando una inversión de la ratio normal EBNA1/EBNA2, al igual

que ocurre en otras enfermedades como el linfoma de Hodking. Estos hallazgos sugieren que el desarrollo de la respuesta de los linfocitos T CD4 y de los anticuerpos EBNA-1 refleja el establecimiento y mantenimiento del estado de portador asintomático (82).

Sin embargo, un estudio prospectivo, de los pocos en población europea, no ha encontrado que las personas que no producen o pierden los anticuerpos EBNA tengan más probabilidad de desarrollar una infección crónica por VEB u otras complicaciones (83).

En nuestra cohorte también observamos que ninguno de los pacientes “respondedores tardíos” y “no respondedores” presentó síntomas de infección crónica, por lo que parece que el retraso en desarrollar anticuerpos EBNA no tendría implicación clínica, aunque harían falta estudios con seguimiento más largo y con más número de pacientes para poder asegurarlo.

6.2.3 ADN viral

Algunos de los pacientes en seguimiento por una respuesta serológica “atípica” presentaron episodios de viremia tras las primoinfección. No podemos comparar estos resultados con los que

tuvieron una respuesta serológica adecuada, siendo ésta una de las limitaciones para su interpretación.

En los años 90, aparecen las primeras publicaciones del grupo japonés de Kimura sobre la detección del ADN del VEB mediante técnicas de PCR en plasma y en células mononucleares (59,84). Ellos describen como en los pacientes con MI se detectan cifras de ADN VEB libre en suero del orden de 5.000-10.000 copias/mL, que se negativizan conforme se resuelven los síntomas, aunque a veces pueden persistir hasta 1 año, pero nunca sobrepasando esos niveles (10,84). En cambio, en procesos asociados al VEB como la infección crónica activa (CAVEB) o los trastornos linfoproliferativos, los niveles son siempre más elevados, del orden de 10^4 - 10^7 copias/mL (59).

No puede asegurarse que la presencia de ADN VEB encontrada en los casos estudiados se deba a una reactivación asintomática o a un episodio de viremia aislado, ya que como está descrito en algún estudio prospectivo un único episodio de viremia no es necesariamente una reactivación (85). Según Chan, la presencia de ADN VEB en suero puede estar presente tanto en caso de primoinfección como de reactivación, sin poder discriminar estas dos posibilidades a menos que nos ayudemos con la serología (44). Sin embargo, en el estudio no se detectaron anticuerpos frente al antígeno precoz (AP) y solo en 1 caso se detectó aumento de los

títulos de IgG VCA, por lo que no pudo confirmarse que se tratara de reactivaciones.

En los siguientes años tras la realización de este estudio, existe una mayor disponibilidad de técnicas de detección PCR de ADN que pueden ayudar al diagnóstico de infección aguda en los casos con una serología dudosa, aunque sólo están dirigidas a monitorizar a individuos de riesgo, como post-trasplantados (20).

Ya que durante el seguimiento de las infecciones por VEB pueden producirse viremias aisladas que no se asocian a una reactivación viral, pero que necesitan interpretarse mediante la serología, no parece recomendable la detección sistemática de ADN viral en el seguimiento de los pacientes. Solo en caso de manifestaciones clínicas crónicas estaría indicada la cuantificación de la carga viral en células mononucleares junto con la serología, ya que permitiría diferenciar una reactivación de la infección crónica activa por VEB (CAVEB).

.3. INDEPENDENCIA Y CONCORDANCIA ENTRE IGM VCA Y IGG EBNA

La prueba de independencia y concordancia demostró que la IgM VCA y los IgG EBNA son marcadores independientes a la hora de catalogar el estado de seroconversión de un individuo, sin importar el momento en que se mida desde la primoinfección.

La desaparición de la IgM VCA tras la primoinfección y la aparición de los anticuerpos EBNA siguen una cinética diferente. En el diseño del estudio tuvimos en cuenta ambos criterios para catalogar la seroconversión hasta los 12 meses. Pero, al intuir esta independencia, a partir de los 12 meses el criterio de seroconversión se centró en la creación de los anticuerpos EBNA.

Algunas consideraciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de decidir la utilidad en la práctica de estas determinaciones. Como ya se ha apuntado anteriormente, una de las limitaciones de la IgM es la posibilidad de reacciones cruzadas con otras infecciones intercurrentes subclínicas, que suelen asociarse con frecuencia en la infancia.

Los criterios diagnósticos propuestos para la infección crónica por VEB tampoco incluyen los anticuerpos IgM VCA, ni los anticuerpos IgG EBNA (25), aunque si se ha descrito que en estos pacientes suelen estar ausentes o disminuidos (27,28,86).

Podemos concluir que la aparición de anticuerpos IgG EBNA es mejor marcador de seroconversión que la negativización de la IgM VCA. Por eso, pensamos que no es preciso monitorizar la serología si no hay clínica tras la primoinfección. No obstante, si se han solicitado y los anticuerpos IgG EBNA son negativos, sí que sería recomendable repetirlos más adelante (en unos 6 meses) y vigilar la aparición de

clínica compatible con infección crónica viral. Si aparecen síntomas de infección crónica sí se debe solicitar la serología completa (IgM VCA, IgG VCA, IgG AP, IgG EBNA) con cuantificación de los títulos de IgG VCA y determinación del ADN viral con cuantificación de la carga viral en plasma.

. . VARIABLES ASOCIADAS CON LA SEROCONVERSIÓN

Aunque el estudio se diseñó teniendo en cuenta como marcadores de seroconversión la negativización de la IgM VCA de manera conjunta con la aparición de IgG EBNA positivos, se consideró interesante analizar también los resultados teniendo en cuenta sólo la negativización de la IgM VCA y sólo la aparición de los IgG EBNA, independientemente del resto de marcadores serológicos.

Respecto a la variable sexo las mujeres tardaron más en seroconvertir (negativizar IgM VCA y positivizar los IgG EBNA) que los varones. Por otro lado, no hubo diferencias entre varones y mujeres en la aparición aislada de los anticuerpos EBNA.

El sexo femenino parece asociarse en retrasar la desaparición de la IgM VCA. No se ha descrito predilección por ningún sexo en la primoinfección por el VEB ni en la infección crónica por VEB. Ninguno de los estudios prospectivos publicados hasta el momento habían

analizado diferencias en la evolución serológica según el sexo, por lo que es importante conocer este dato a la hora de interpretar la respuesta serológica tras la primoinfección por el VEB.

Si que se conocen datos sobre como el sexo y el género influyen en la respuesta inmune frente a las infecciones y frente a las vacunaciones. Una de las principales diferencias es que las mujeres tienen una respuesta más intensa tanto de la inmunidad innata, como de la inmunidad adquirida (humoral y celular). Estas diferencias se atribuyen tanto a factores hormonales como a factores genéticos ligados al cromosoma X (87,88). En general, las mujeres son más inmuno-reactivas frente a las infecciones virales y más sintomáticas, y tienen más predisposición a desarrollar efectos inmuno-patogénicos y autoinmunidad. Esta mayor intensidad en la respuesta inmune podría explicar el retraso en la desaparición de la IgM VCA y en el cambio de clase en las niñas de nuestra muestra.

Sería interesante conocer en futuros estudios que factores genéticos asociados al sexo femenino podrían influir en una respuesta serológica o inmune diferente en el caso de la infección por el VEB.

El modelo de supervivencia no encontró ninguna influencia de la edad en el tiempo hasta seroconvertir. Pero, en el análisis univariante, ser mayor se asoció con tardar más tiempo en

negativizar la IgM VCA y desarrollar anticuerpos IgG EBNA, y también con más tiempo en desaparecer la IgM VCA de manera aislada.

La positividad de la IgM VCA en la primoinfección tiene una clara relación con la edad, y a menor edad hay más tasa de falsos negativos para la IgM VCA (80). En un estudio retrospectivo en niños japoneses con MI no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la edad y la aparición de anticuerpos EBNA, aunque las tasa de EBNA negativos fue mayor en los mayores de 4 años (80). La mayoría de trabajos prospectivos han sido en estudiantes universitarios, por lo que no han podido analizar la influencia de la edad en la seroconversión o en la persistencia de la IgM VCA. Podríamos pensar que encontrar la IgM VCA positiva pudo deberse a una reactivación, pero en ninguno de los casos encontramos anticuerpos frente al antígeno precoz ni carga viral positiva. No podemos descartar que se tratara de un falso positivo o una reacción cruzada con otros virus, aunque ningún paciente tuvo ninguna manifestación clínica coincidiendo con la determinación. Por otro lado, como ya se ha expuesto anteriormente, la respuesta de los linfocitos CD4, juega un papel importante en la fase de latencia del virus (49). En los niños mayores hay un predominio de la respuesta de los linfocitos T CD8, por lo que una respuesta insuficiente de los linfocitos CD4 podría impedir que haya un cambio de clase y que persista la producción de anticuerpos IgM.

En cuanto a la forma de presentación clínica durante la primoinfección, tener una clínica típica (MI) se asoció con tardar más tiempo en tener IgG EBNA positivos.

Nadie ha analizado las diferencias en la evolución serológica según la forma de presentación clínica durante la primoinfección. Los diferentes estudios retrospectivos y prospectivos publicados evalúan únicamente pacientes con clínica típica o MI, por lo que no podemos saber si la tasa de seroconversión es diferente según el tipo de clínica. Es por tanto la primera vez que hemos encontrado que padecer una MI durante la primoinfección puede retrasar la aparición de los anticuerpos EBNA.

La aparición de los anticuerpos EBNA viene condicionada por la expresión de las proteínas de la fase de latencia y la correcta regulación de la respuesta inmune por los linfocitos CD4. El aumento de la respuesta de los linfocitos CD8 propio de la mononucleosis infecciosa podría condicionar una baja respuesta de los linfocitos CD4 y por tanto un retraso en la fase de latencia y en la aparición de los anticuerpos EBNA.

Los niños con valores de GOT y GPT más elevados en la primoinfección tardaron más tiempo en negativizar la IgM VCA y desarrollar los IgG EBNA. Otros estudios han descrito valores más altos de enzimas hepáticas durante la primoinfección por VEB en

adolescentes y jóvenes que en niños pequeños (62,68). Parece lógico que si en nuestra muestra tardan más en negativizar la IgM VCA los más mayores, y tardan más en producir EBNA los de clínica típica, también veamos una correlación entre cifras más altas de transaminasas y pacientes que tardan más en negativizar la IgM y aparecer los EBNA. Podríamos pensar que hay mayor intensidad clínica y afectación hepática debido a una mayor respuesta CD8, lo que podría enlentecer o entorpecer la fase de latencia y que persistiera la IgM VCA más tiempo y tardaran en aparecer los anticuerpos EBNA.

Por último, respecto a la presencia de ADN viral, no pudimos obtener ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variables y la presencia de carga viral, ya que fueron muy pocos los pacientes con ADN positivo en el seguimiento. No obstante, según nuestros resultados no parece que el retraso en aparecer los anticuerpos EBNA se asocie con la presencia de ADN viral.

Ninguno de los estudios prospectivos publicados ya comentados busca correlacionar la presencia de carga viral con la respuesta serológica, se centran en relacionar la carga viral con la respuesta inmune frente al virus.

. . . PROBABILIDAD DE NO REALIZAR SEROCONVERSIÓN

Uno de los objetivos del estudio fue describir la probabilidad de no realizar seroconversión tras una primoinfección por VEB ya que no aparece descrito en la literatura. Cuando se solicita un control serológico tras una primoinfección se desconoce cual es la probabilidad de que todavía no hayan aparecido los IgG EBNA y si esto debe de preocupar.

Las probabilidades de no seroconvertir en los diferentes momentos tras la primoinfección son mayores cuando se tienen en cuenta los dos marcadores serológicos a la vez que si los consideramos por separado. Pero como ya se ha comentado anteriormente, es mejor marcador de seroconversión la aparición de los anticuerpos EBNA y es preferible reflejar la probabilidad de no seroconvertir en base a este marcador serológico.

En este estudio la probabilidad de no tener IgG EBNA a los 6 meses de la primoinfección fue de un 48%. Se trata de una probabilidad más alta de lo esperado según lo publicado en la “literatura clásica”, dónde a los 6 meses ya aparecen los anticuerpos EBNA. Sería interesante en futuros estudios, el seguimiento de los pacientes con EBNA negativos durante más tiempo, para poder establecer si se trata de un factor de riesgo para desarrollar cronicidad de la infección por VEB o desarrollar patología tumoral asociada al VEB.

A pesar de rechazar la negativización de la IgM VCA como marcador de seroconversión, parece útil conocer la probabilidad de que persista la IgM VCA positiva cuando se repite una serología tras una primoinfección. En este estudio obtuvimos una alta probabilidad de encontrar una IgM VCA persistentemente positiva. Hubo casos con IgM VCA positiva tras 12 meses que no continuaron en el estudio por haber creado anticuerpos EBNA y no tener ADN viral positivo. Esto ha supuesto una limitación a la hora de evaluar el comportamiento de la IgM VCA más allá de los 12 meses, pues fueron pocos los casos con seguimiento. Es por ello que al calcular la probabilidad de que persista la IgM VCA positiva se mantiene igual a los 12, 18 y 24 meses tras la primoinfección.

. . . FUNCIÓN INMUNE CELULAR

Al no disponer de las poblaciones linfocitarias de toda la cohorte, no hemos podido compararlas entre los pacientes que han realizado una respuesta serológica típica y los que no. No obstante, hemos podido describir los hallazgos en las poblaciones linfocitarias de aquellos pacientes en los que se ha retrasado la aparición de los anticuerpos EBNA o no han llegado a aparecer, así como en aquellos en los que se ha producido un episodio de viremia durante el seguimiento.

6.6.1 Pacientes con IgG EBNA negativos

Aunque sin significación estadística por la muestra tan pequeña, se observó que era más frecuente la presencia de alguna alteración en las subpoblaciones linfocitarias en los pacientes con EBNA negativos a los 12 meses de la primoinfección. Lo esperable hubiera sido encontrar alguna alteración a nivel de los linfocitos T helper CD4 de estos pacientes “respondedores tardíos”, los cuales juegan un papel importante en el establecimiento de la fase de latencia (48,49). Sin embargo, ninguno de los pacientes “respondedores tardíos” ni “no respondedores” mostraron una disminución en los valores de los linfocitos T CD4. No obstante, al ser la citometría de flujo un método cuantitativo, no podemos conocer lo que está pasando a nivel funcional en los linfocitos T CD4 de esos niños. En algunos de los pacientes “respondedores tardíos” o “no respondedores” sí que hemos objetivado un aumento de la respuesta de los CD8 más allá de la primoinfección y una disminución del índice CD4/CD8, lo que podría reflejar una disminución relativa de los linfocitos T CD4, aunque no se afecte su número absoluto. La disminución de los linfocitos B CD19, también se detectó en “respondedores tardíos” y “no respondedores”, aunque los linfocitos B circulantes en sangre periférica no se ha descrito que participen directamente en el control de la fase de latencia.

La existencia de una posible disfunción del sistema inmune en aquellos individuos que no realizan una adecuada fase de latencia está menos estudiada, así como si esto les predispone a una mayor probabilidad de desarrollar alguna de las enfermedades relacionadas con el VEB como la infección crónica o trastornos linfoproliferativos. Long et al. (82) aportan algo de luz a esta diferente manera de comportarse algunos individuos tras el establecimiento de la infección latente. En su cohorte demuestran como a diferencia de la respuesta de los linfocitos T CD4 frente a los antígenos de latencia EBNA 2 y otras proteínas líticas, la respuesta frente a los epítomos de EBNA 1 está enormemente retrasada, al igual que la producción de los anticuerpos IgG EBNA1 que incluso pueden no llegar a aparecer. La proteína EBNA1 no es presentada como antígeno a los linfocitos T CD4, a diferencia de las otras proteínas. Parece ser que la presentación como antígeno de la proteína de latencia EBNA1 ocurre de manera endógena intracelularmente, por vías como la macroautofagia, a diferencia de las otras proteínas líticas y de latencia que se secretan al medio y son adquiridas exógenamente por las células vecinas presentadoras de antígeno (48). Quizá esto explica por qué sólo una minoría de los epítomos de EBNA1 son mostrados en la superficie en cantidades que puedan ser detectadas por los linfocitos T CD4 específicos, o en algunos casos ni siquiera se conseguirían expresar.

Como ya se ha comentado, se han descrito genes a nivel de la región HLA (HLA-DRB1 y HLA-DQB1) relacionados con la respuesta serológica individual frente al VEB y no frente a otros patógenos (81). Estos loci ya se conoce que están involucrados en la presentación de antígenos a los linfocitos T.

6.6.2 Pacientes con ADN viral positivo

Las alteraciones que hemos encontrado en los pacientes con ADN positivo para el VEB en algún momento de su seguimiento concuerdan con lo esperado. En el caso de los pacientes 7 y 84, el aumento de los linfocitos T CD8 son la respuesta esperada frente a una viremia, aunque en este caso no se asoció a ninguna manifestación clínica como había ocurrido en la primoinfección. En el paciente 51, en cambio, se detectaron valores muy bajos de las células NK coincidiendo con un episodio de viremia a los 12 meses de la primoinfección, y también sin ninguna manifestación clínica. Como ya hemos referido antes, se ha descrito tanto una repuesta proporcional a la carga viral de las células NK como una respuesta inversa al igual que en nuestro caso (49).

En la cohorte de estudiantes de Balfour (19), observaron como la expansión de las células NK se correlacionaba positivamente con el

número de linfocitos CD8 y con la carga viral en sangre, así como con la gravedad de la enfermedad, sobre todo en las 2 semanas tras la aparición de los síntomas, pero esta correlación no era tan clara en los 3 meses posteriores y está poco estudiada más allá de ese tiempo. En nuestra cohorte, los casos 7 y 84 también muestran un aumento de los linfocitos CD8 y NK que se mantiene en el seguimiento.

Los pacientes con primoinfección asintomática están menos estudiados, pero el seguimiento prospectivo de 5 casos, sugirió que durante la fase aguda tuvieron una carga viral similar a los pacientes con MI y que en algunos casos la respuesta inmune fue cualitativamente similar, pero de menor magnitud, aunque en otros pacientes podrían desarrollar una respuesta inmune diferente frente al virus (89).

. . LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio longitudinal prospectivo de un grupo de pacientes con primoinfección sintomática por VEB, en los que se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo. No obstante, a los niños que tuvieron una respuesta serológica definida como “adecuada”, por motivos éticos no se les hicieron más extracciones analíticas, por lo que la muestra de pacientes que han llegado a las últimas fases del

estudio fue reducida. De esta manera, no pudimos comparar las poblaciones linfocitarias de los niños que no realizaron una seroconversión con los que sí la realizaron.

Por otro lado, no se solicitaron poblaciones linfocitarias hasta los controles de los 18 y 24 meses, por lo que no disponemos de datos sobre la función inmune en todos los puntos de corte del estudio. La asociación entre los parámetros de seroconversión y las poblaciones linfocitarias se ha realizado en momentos temporales diferentes (seroconversión a los 12 meses y función inmune a los 18 y 24 meses).

Debido a los criterios de inclusión del estudio no se incluyeron pacientes con primoinfección asintomática, pero sí que conseguimos excluir el sesgo de que fueran únicamente pacientes hospitalizados como en muchos de los estudios publicados. Además, hemos podido analizar casos de primoinfección oligosintomática y con clínica atípica, y no únicamente casos con MI.

A pesar de haber conseguido el tamaño muestral calculado, nos encontramos con la presencia de casos dudosos de primoinfección por VEB por posibles falsos positivos de la IgM VCA, que no habíamos tenido en cuenta a la hora de calcular el tamaño muestral y que supuso una disminución de la muestra. La IgM VCA como criterio de selección de los casos, tuvo la limitación de las posibles reacciones

cruzadas con otros virus o patógenos y puso de manifiesto la importancia de interpretar sus resultados en correlación con la clínica y con los IgG VCA y los IgG EBNA. En el momento actual, ante la sospecha de primoinfección por VEB, nuestro laboratorio realiza la serología completa con IgM VCA, IgG VCA e IgG EBNA mediante el método Architect, con lo que podemos diagnosticar la primoinfección por VEB de manera más precisa, y disminuir el riesgo de incluir falsos positivos para la IgM VCA. Cada vez más, se defiende la detección del ADN viral en el contexto de clínica de primoinfección como criterio para diagnosticarla, ya que también puede haber falsos negativos para la IgM VCA. No obstante, la detección del ADN viral sigue siendo una técnica no disponible en todos los centros y con mayor coste y aún sin estandarizar.

Aun así, en la actualidad ya se utiliza en casos de pacientes inmunocompetentes dudosos o en aquellos centros donde es accesible, pero no por ello debe dejarse de interpretar junto con la serología (IgM VCA, IgG VCA e IgG EBNA), ya que como hemos dicho, podríamos encontrar episodios de viremia del VEB en sangre en pacientes portadores sanos. Por todo ello, sigue siendo importante continuar conociendo la respuesta serológica frente al virus y su evolución en el tiempo.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Las características epidemiológicas y clínicas de la primoinfección por VEB en la población pediátrica de nuestra área geográfica no mostraron diferencias con las publicadas en otros estudios, salvo con los realizados en población asiática, dónde la edad fue menor.
2. La clínica no típica u oligosintomática se asoció a una menor edad, a una menor elevación de la proteína C reactiva y a mayor probabilidad de tener la IgM VCA indeterminada en comparación con el grupo de clínica típica.
3. El sexo femenino, la mayor edad y el aumento de transaminasas durante la primoinfección se asociaron significativamente con el retraso en la desaparición de la IgM VCA y la aparición de los IgG EBNA de manera conjunta. Aunque sólo la influencia del sexo femenino se confirmó en el modelo de supervivencia.
4. Tener una clínica típica (MI) durante la primoinfección se asoció con el retraso en la aparición de los anticuerpos IgG EBNA, sin confirmarse en el modelo de supervivencia.

5. El sexo femenino y la mayor edad, se asociaron significativamente con la persistencia de la IgM VCA, pero no se confirmaron en el modelo de supervivencia.
6. La aparición de los anticuerpos IgG EBNA fue mejor marcador de seroconversión que la desaparición de la IgM VCA. Ambos marcadores son independientes y no existe correlación entre ellos.
7. En la población analizada, la probabilidad de no crear anticuerpos IgG EBNA tras la primoinfección fue de un 48% a los 6 meses, de un 25 % a los 12 meses y un 10% a los 2 años.
8. En la muestra estudiada, la probabilidad de persistencia de la IgM VCA positiva tras la primoinfección fue de un 36% a los 6 meses y de un 14% a los 12 meses y a los 2 años.
9. Los casos “respondedores tardíos” y “no respondedores” fueron poco frecuentes. Ninguno presentó síntomas de cronicidad.
10. No hemos podido demostrar la asociación de ninguna variable con la presencia de ADN viral. Esto nos hace recomendar la determinación del ADN viral sólo en casos con clínica de cronicidad y su interpretación junto con la serología completa. En algunos casos se detectado un episodio de

viremia durante el seguimiento sin ninguna manifestación clínica y sin datos serológicos de reactivación.

11. No se ha demostrado ninguna disfunción inmune concreta en los casos con retraso o ausencia de la seroconversión, aunque sí que fue más frecuente en ellos encontrar alguna de las subpoblaciones linfocitarias alteradas.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 1984;310(5974):207–11.
2. Leach CT, Sumaya C V, Harrison GJ. Epstein-Barr Virus. Seventh Ed. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier Inc.; 1992-2015.e12 p.
3. Martin Ruano, J. LRJ. Mononucleosis infecciosa en la infancia. *Pediatr Integr*. 2014;XVIII(3):141–52.
4. David Navarro Ortega. Diagnostico de la mononucleosis infecciosa causada por le virus de Epstein-Barr. Control calidad SEIMC.
5. Sitki-Green DL, Edwards RH, Covington MM, Raab-Traub N. Biology of Epstein-Barr virus during infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 2004 Feb 1;189(3):483–92.
6. Santpere G, Darre F, Blanco S, Alcami A, Villoslada P, Albà MM, et al. Genome-wide analysis of wild-type epstein-barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1000 genomes project. *Genome Biol Evol*. 2014;6(4).
7. Stanfield BA, Luftig MA. Recent advances in understanding Epstein-Barr virus. *F1000Research*. 2017 Mar 29;6:386.
8. Luzuriaga K, Sullivan JL. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. 2010 May 27;362(21):1993–2000.
9. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000 Aug 17;343(7):481–92.
10. De Paschale M, Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr

virus infection: Problems and solutions. *World J Virol.* 2012 Feb 12;1(1):31–43.

11. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jan;24(1):193–209.
12. Albanese M, Tagawa T, Buschle A, Hammerschmidt W. MicroRNAs of Epstein-Barr Virus Control Innate and Adaptive Antiviral Immunity. *J Virol.* 2017;91(16).
13. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol.* 2008 Jan;18(5):305–19.
14. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med.* 1993 Jan 1;118(1):45–58.
15. Pariente M, Bartolomé J, Lorente S, Crespo D, Microbiología L De, Hospitalario C, et al. Distribución por edad de los patrones serológicos de infección por el virus de Epstein-Barr : revisión de resultados de un laboratorio de diagnóstico. *Enfermedades Infecc y Microbiol clínica.* 2007;25(2):108–10.
16. Antonio Martínez Pérez J, Gimeno Fernández C, Praetorius AG, Luengo MG, José M, Orduña C, et al. Seroprevalencia de tres tipos de virus hepatotropos en población adolescente de la provincia de Guadalajara. *Rev Esp Salud Publica.* 2001;75:151–8.
17. Huang Y, Wei C, Zheng K, Zhao D. The impact of serological features in Chinese children with primary or past Epstein-Barr virus infections. *Virol J.* 2013 Jan;10:55.
18. Sumaya C V, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics.* 1985 Jun;75(6):1011–9.

19. Balfour HH, Odumade OA, Schmeling DO, Mullan BD, Ed JA, Knight JA, et al. Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis.* 2013 Jan 1;207(1):80–8.
20. Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH. Primary Epstein-Barr virus infection. Vol. 102, *Journal of Clinical Virology.* 2018. p. 84–92.
21. Chijioke O, Müller A, Feederle R, Barros MHM, Krieg C, Emmel V, et al. Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. *Cell Rep.* 2013;5(6).
22. Kimura H, Cohen JI. Chronic active Epstein-Barr virus disease. *Front Immunol.* 2017;8:1867.
23. Lu G, Xie Z, Zhao S, Ye L, Wu R, Liu C, et al. Clinical analysis and follow-up study of chronic active Epstein-Barr virus infection in 53 pediatric cases. *Chin Med J (Engl).* 2009 Feb 5;122(3):262–6.
24. Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK, Pittaluga S, Heslop HE, Rooney CM, et al. Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: A 28-year experience in the United States. *Blood.* 2011;117(22):5835–49.
25. Okano M, Kawa K, Kimura H, Yachie A, Wakiguchi H, Maeda A, et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol.* 2005 Sep;80(1):64–9.
26. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K-I, Arai A, Kodama E, Morio T, et al. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int.* 2014;56(2):160–6.
27. Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H, Tsuge I, Okamura T, Kawa K,

- et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*. 2001 Jul 15;98(2):280–6.
28. Okano M, Matsumoto S, Osato T, Sakiyama Y, Thiele GM, Purtilo DT. Severe chronic active Epstein-Barr virus infection syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4(1):129–35.
 29. Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, Harrison N, et al. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2018 Dec 26];129(2):266–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15813855>
 30. Chijioke O, Azzi T, Nadal D, Münz C. Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol*. 2013;94(December).
 31. Sumaya C V. Epstein-Barr virus serologic testing: diagnostic indications and interpretations. *Pediatr Infect Dis*. 1986 Jan;5(3):337–42.
 32. Middeldorp JM. Epstein-Barr Virus-Specific Humoral Immune Responses in Health and Disease. In: *Current topics in microbiology and immunology*. 2015. p. 289–323.
 33. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. Vol. 42, *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. p. 3381–7.
 34. Schuster V, Kreth HW. Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. II. Diagnostic and therapeutic strategies. *Eur J Pediatr*. 1992 Nov;151(11):794–8.
 35. Sumaya C V, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics*. 1985 Jun;75(6):1003–10.

36. Crawford DH, Macsween KF, Higgins CD, Thomas R, Mcaulay K, Williams H, et al. Identification of Risk Factors for Epstein-Barr Virus Seroconversion and Infectious Mononucleosis. 2006.
37. Rea TD, Russo JE, Katon W, Ashley RL, Buchwald DS. Prospective Study of the Natural History of Infectious Mononucleosis Caused by Epstein-Barr Virus. 2001;14(4):234–42.
38. Rea TD, Ashley RL, Russo JE, Buchwald DS. A Systematic Study of Epstein-Barr Virus Serologic Assays Following Acute Infection. *Am J Clin Pathol*. 2002 Jan 1;117(1):156–61.
39. Fleisher GR, Collins M, Fager S. Humoral immune response in infectious mononucleosis. Late emergence of anti-EA(R) and the effects of corticosteroid therapy. *J Adolesc Health Care*. 1985 Nov;6(6):424–8.
40. Grimm JM, Schmeling DO, Dunmire SK, Knight JA, Mullan BD, Ed JA, et al. Prospective studies of infectious mononucleosis in university students. *Clin Transl Immunol*. 2016 Aug 12;5(8):e94.
41. Bu W, Hayes GM, Liu H, Gemmell L, Schmeling DO, Radecki P, et al. Kinetics of Epstein-Barr Virus (EBV) Neutralizing and Virus-Specific Antibodies after Primary Infection with EBV. *Clin Vaccine Immunol*. 2016 Apr;23(4):363–9.
42. Balfour HH, Holman CJ, Hokanson KM, Lelonek MM, Giesbrecht JE, White DR, et al. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 2005 Nov 1;192(9):1505–12.
43. Miller G, Grogan E, Rowe D, Rooney C, Heston L, Eastman R, et al. Selective lack of antibody to a component of EB nuclear antigen in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis*. 1987 Jul;156(1):26–35.

44. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. *J Clin Microbiol.* 2001 Nov;39(11):4152–4.
45. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn.* 2008 Jul;10(4):279–92.
46. Balfour HH, Sifakis F, Sliman JA, Knight JA, Schmeling DO, Thomas W. Age-Specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition. *J Infect Dis.* 2013;208(8).
47. Callan MFC. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 2004;6:937–45.
48. Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Mü Nz C, Hislop AD. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 2014;35:159–69.
49. Tangye SG, Palendira U, Edwards ESJ. Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J Exp Med.* 2017;214(2):269–83.
50. Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallacher NJ, Higgins CD, Harrison N, et al. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol.* 2005;129(2):266–74.
51. Sauce, D. Larsen Martin, Curnow S.J, Leese AM, Moss Paul AH HAD et al. EBV-associated mononucleosis leads to long-term global deficit in T-cell responsiveness to IL-15. *Blood.* 2006 Jul 1;108(1):11–8.
52. Silins SL, Sherritt MA, Silleri JM, Cross SM, Elliott SL, Bharadwaj M, et al. Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood.*

- 2001;98(13):3739–44.
53. Panikkar A, Smith C, Hislop A, Tellam N, Dasari V, Hogquist KA, et al. Impaired Epstein-Barr Virus-Specific Neutralizing Antibody Response during Acute Infectious Mononucleosis Is Coincident with Global B-Cell Dysfunction. *J Virol*. 2015;
 54. Dunmire SK, Grimm JM, Schmeling DO, Balfour HH, Hogquist KA. The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog*. 2015;11(12).
 55. Gärtner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K, et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Jan;10(1):78–82.
 56. de Ory F, Guisasola ME, Sanz JC, García-Bermejo I. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Mar;18(3):444–8.
 57. Corrales I, Giménez E, Navarro D. Evaluation of the Architect Epstein-Barr Virus (EBV) viral capsid antigen (VCA) IgG, VCA IgM, and EBV nuclear antigen 1 IgG chemiluminescent immunoassays for detection of EBV antibodies and categorization of EBV infection status using immunofluorescence a. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 May;21(5):684–8.
 58. Guerrero-Ramos A, Patel M, Kadakia K, Haque T. Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Jun;21(6):817–23.

59. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999 Jan;37(1):132–6.
60. Gao L-W, Xie Z-D, Liu Y-Y, Wang Y, Shen K-L. Epidemiologic and clinical characteristics of infectious mononucleosis associated with Epstein-Barr virus infection in children in Beijing, China. *World J Pediatr.* 2011 Mar;7(1):45–9.
61. Grotto I, Mimouni D, Huerta M, Mimouni M, Cohen D, Robin G, et al. Clinical and laboratory presentation of EBV positive infectious mononucleosis in young adults. *Epidemiol Infect.* 2003 Aug;131(1):683–9.
62. González Saldaña N, Monroy Colín VA, Piña Ruiz G, Juárez Olgún H. Clinical and laboratory characteristics of infectious mononucleosis by Epstein-Barr virus in Mexican children. *BMC Res Notes.* 2012 Jan;5:361.
63. Carbonero Celis, MJ , Torronteras Santiago R CBC. Infectious mononucleosis: study in hospitalized children. *An españoles pediatría.* 1999;51:664–6.
64. Field N, Cohen T, Struelens MJ, Palm D, Cookson B, Glynn JR, et al. Strengthening the Reporting of Molecular Epidemiology for Infectious Diseases (STROME-ID): an extension of the STROBE statement. *Lancet Infect Dis.* 2014 Apr;14(4):341–52.
65. Gallo V, Egger M, McCormack V, Farmer PB, Ioannidis JPA, Kirsch-Volders M, et al. STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology - Molecular Epidemiology (STROBE-ME): An extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest.* 2012 Jan;42(1):1–16.
66. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte

- subpopulations. *J Pediatr.* 1997 Mar;130(3):388–93.
67. Chen Q, Wu H, Ware LB, Koyama T. A Bayesian Approach for the Cox Proportional Hazards Model with Covariates Subject to Detection Limit. *Int J Stat Med Res.* 2014 Jan 31;3(1):32–43.
68. Fourcade G, Germe R, Guerber F, Lupo J, Baccard M, Seigneurin A, et al. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. *PLoS One.* 2017;12(4).
69. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am Fam Physician.* 2004 Oct 1;70(7):1279–87.
70. Sánchez Echaniz J., Mintegui Raso S., Benito Fernandez J. CCJM. Síndromes mononucleósicos con serologías doblemente positivas a virus Epstein-Barr y citomegalovirus. *An españoles pediatría.* 1996;45:242–4.
71. Linderholm M, Boman J, Juto PER, Linde A. Comparative Evaluation of Nine Kits for Rapid Diagnosis of Infectious Mononucleosis and Epstein-Barr Virus-Specific Serology. 1994;32(1):259–61.
72. Brkić S, Jovanović J, Preveden T, Vukobratov Z. Serologic profile of Epstein-Barr virus infection in acute infectious mononucleosis. *Med Pregl.* 2003 Jan;56(1–2):7–16.
73. Bertram G, Dreiner N, Krueger GR, Ramon A, Ablashi D V, Salahuddin SZ, et al. Frequent double infection with Epstein-Barr virus and human herpesvirus-6 in patients with acute infectious mononucleosis. *In Vivo.* 1991;5(3):271–9.
74. Berth M, Bosmans E. Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determinations done on the Liaison platform. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;

75. Berth M, Bosmans E. Prevention of assay interference in infectious-disease serology tests done on the liaison platform. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(5):891–2.
76. Lucas Sendra R, Velilla Antolín D, Mares Diago FJ, Plaza Miranda MA, Navarro Ortega D. [Infectious mononucleosis and severe thrombocytopenia]. *An Pediatr (Barc)*. 2012 Sep;77(3):200–2.
77. Medović R, Igrutinović Z, Radojević-Marjanović R, Marković S, Rašković Z, Simović A, et al. Clinical and laboratory differences between Epstein–Barr and cytomegalovirus infectious mononucleosis in children. *Srp Arh Celok Lek*. 2016;144(1–2).
78. Arvin AM. Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Jul;9(3):361–81.
79. Sikuler E, Keynan A, Hanuka N, Zagron-Bachir G, Sarov I. Persistence of a positive test for IgM antibodies to hepatitis A virus in late convalescent sera. *Isr J Med Sci*. 1987 Mar;23(3):193–5.
80. Dohno S, Maeda A, Ishiura Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H. Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. *Pediatr Int*. 2010;52:536–40.
81. Rubicz R, Yolken R, Drigalenko E, Carless MA, Dyer TD, Bauman L, et al. A Genome-Wide Integrative Genomic Study Localizes Genetic Factors Influencing Antibodies against Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA-1). *PLoS Genet*. 2013;9(1).
82. Long HM, Chagoury OL, Leese AM, Ryan GB, James E, Morton LT, et al. MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*. 2013;210(5):933–49.

83. Brkić S, Jovanović J, Preveden T. [Chronic infectious mononucleosis]. *Med Pregl.* 2003 Jan;56(7–8):366–72.
84. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, Hirai K, Hasegawa S, Kuzushima K, et al. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1765–8.
85. Maurmann S, Fricke L, Wagner H-J, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5419–28.
86. Kanegane H, Wakiguchi H, Kanegane C, Kurashige T, Miyawaki T, Tosato G. Increased Cell-Free Viral DNA in Fatal Cases of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection and the Department and the Downloaded from. *Clin Infect Dis.* 1999;28:906–9.
87. Van Lunzen J, Altfeld M. Sex Differences in Infectious Diseases-Common but Neglected. *J Infect Dis.* 2014;209(S3):79–80.
88. Ruggieri A, Anticoli S, D’ambrosio A, Giordani L, Viora M. Monographic section The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Ann Ist Super Sanità.* 2016;52(2):198–204.
89. Abbott RJ, Pachnio A, Pedroza-Pacheco I, Leese AM, Begum J, Long HM, et al. Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. Longnecker RM, editor. *J Virol.* 2017 Nov 1;91(21).

ANEXOS

9. ANEXOS

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Don/Doña....., en calidad de padre/madre o tutor de

y/o.....mayor de 12 años de edad

Aceptan participar en el estudio “**EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE EPSTEIN BARR EN NIÑOS**”, y confirman que han sido informados de los objetivos de éste y de que consistirán en:

- Control clínico y análisis de sangre para detectar el Virus Epstein Barr y la respuesta del organismo frente a su infección a los 6 meses de la primera determinación.
- Seguimiento clínico y analítico según resultados.
- Permiso para incorporar los datos personales (nombre y SIP) en una base de datos. Los datos personales de su hijo/a serán tratados de manera confidencial, y se procesarán conforme a la Ley Orgánica de protección de Datos de Carácter Personal (15/1999, del 13 de Diciembre)

Don/Doña.....y/o.....firman el presente consentimiento, a sabiendas de que pueden retirarse del estudio en cualquier momento, sin necesidad de dar explicaciones, y teniendo garantizada en todo momento la asistencia habitual.

En Xàtiva a

Firma

Firma del médico peticionario

**Mónica García Peris
M. Isabel Jiménez Candel
Yolanda Mañes Jiménez
Servicio de Pediatría**

ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES EXCLUIDOS POR SOSPECHA DE FALSOS POSITIVOS

CASO	EDAD (años)	CLÍNICA	AH	IgM VCA	IgM otros microorganismos
26	2	No típica (Fiebre, exantema y otitis)	-	+	NC
34	7	No típica (Miositis)	-	Ind	NC
37	2	No típica (Adenopatía)	-	Ind	NC
39	14	No típica (Exantema, dolor abdominal, astenia)	-	Ind	NC
46*	3	No típica (PTI)	-	Ind	Herpes 6
76†	5	No típica (adenopatía)	NC	Ind	Coxsackie Echovirus Herpes 6 Varicela
81	11	No típica (Adenopatía)	-	+	NC
92	2	No típica (Fiebre, exantema y otitis)	-	+	NC

93	10	No típica (Fiebre, exantema, adenopatías, hepatoesplenomegalia y leucopenia)	-	+	Parvovirus B19 [†]
----	----	--	---	---	-----------------------------

PTI: Púrpura trombopénica inmune, NC: No consta, Ind: Indeterminada, - : negativos, +: positiva

*Recibió inmunoglobulinas iv previo a la extracción de la serología

†Había pasado varicela las 2 semanas previas

[†]Se confirmó la seroconversión para el Parvovirus B19

ANEXO 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, SEROLÓGICAS E INTERPRETACIÓN DIAGNÓSTICA DE LOS PACIENTES CON DATOS DE COINFECCIÓN

CASO	EDAD (años)	CLÍNICA	AH	IgM VCA VEB	IgM otros microorganismos	Evolución	SOSPECHA DIAGNÓSTICA
5	12	Típica (MI)	+	+	Coxsackie Echovirus Parvovirus B19	EBNA +	Primo infección por VEB, probable reacción cruzada al resto de virus
6	15	Típica (MI)	-	+	Parvovirus B19	EBNA +	Primo infección por VEB, probable reacción cruzada para Parvovirus B19
11	3	Típica (MI)	-	+	Test SGA +	EBNA +	Primo infección por VEB y colonización por SGA
12	1	No típica (Diarrea+ hepatitis)	NC	Ind.	Echovirus	EBNA +	Posible coinfección

19	8	No típica (Urticaria)	NC	Ind	Adenovirus	EBNA +	Posible coinfección
27	6	No típica (Diarrea+hepatitis)	+	+	VHA	EBNA +	Coinfección con VHA
29	3	No típica (Exantema, adenopatías, hepatoesplenomegalia y aftas)	+	+	CMV Mycoplasma Pneumonie	NC	Posible coinfección con CMV Probable reacción cruzada a Mycoplasma Pneumonie
32	7	No típica (Amigdalitis+hepatom egalia)	-	+	CMV Parvovirus B19	EBNA +	Posible coinfección con CMV Probable reacción cruzada para Parvovirus B19*
44	7	Típica (Fiebre,astenia, miositis, vómitos, tos)	NC	Ind.	Mycoplasma Pneumonie	EBNA +	Posible coinfección con Mycoplasma Pneumonie
45	7	No típica (Fiebre,miositis, tos)	NC	Ind.	Influenza B en moco nasal	EBNA +	Posible coinfección con gripe B

53	6	No típica (Fiebre, exantema, ataxia)	-	+	Echovirus Coxsackie	EBNA +	Posible coinfección
63	7	Típica (MI)	+	+	CMV	EBNA +	Posible coinfección o reacción cruzada para CMV
64	8	Típica (fiebre, amigdalitis, dolor abdominal)	+	+	Test SGA +	NC	Posible coinfección SGA
68	15	Típica (MI)	+	+	CMV Parvovirus B19	NC	Posible coinfección con CMV o reacción cruzada Probable reacción cruzada para Parvovirus B19*
71	2	Típica (fiebre, amigdalitis, neumonía)	-	+	Influenza A y B	EBNA +	Posible coinfección
88	15	Típica (adenopatías, astenia)	-	+	CMV	EBNA +	Posible coinfección o reacción cruzada para CMV
91	10	Típica (MI)	+	+	CMV	EBNA +	Posible coinfección o reacción cruzada para CMV
96	2	Típica (Fiebre, adenopatía)	+	+	CMV	EBNA +	Posible coinfección o reacción cruzada para CMV
100	3	Típica (Fiebre, exantema, adenopatía, astenia)	+	+	CMV Herpes simple	NC	Posible coinfección con CMV Probable reacción cruzada para herpes simple

NC: No consta, Ind: Indeterminada, VHA: Virus de la hepatitis A, +: Positivo, -: Negativo

*La infección por Parvovirus B19 suele producir fiebre, exantema y/o alteraciones hematológicas

