

Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8

Standardization of a real-time polymerase chain reaction system for quantification of human herpesvirus 8

Pedro Ariel Martínez Rodríguez^I; Mayra Muné Jiménez^{II}; Yudira Soto Brito^{III}; Rosa Ramírez Bartutis^{IV}; Consuelo Correa Sierra^V; Melkis Alfonso Castellanos^{VI}; Vivian Kourí Cardella^{VII}

^I Máster en Ciencias. Especialista de I Grado en Microbiología (Virología). Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Doctora en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Instructora. Investigadora Titular. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Virología, IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Virología, IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Máster en Ciencias. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Profesora Agregada. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Virología, IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^V Especialista en Medicina General Integral. Residente de la Especialidad Microbiología (Virología). IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{VI} Técnico en Farmacia Industrial. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Virología, IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{VII} Doctora en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología (Virología). Investigadora Auxiliar. Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual, Departamento de Virología, IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

OBJETIVO: normalizar un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la carga viral del herpesvirus humano 8, en diferentes muestras clínicas de pacientes en los que se sospeche la infección por este agente.

MÉTODOS: se evaluaron 3 de los métodos reportados internacionalmente para

obtener ADN estándar en la construcción de curvas externas estándar, que permiten determinar el número de copias de ADN diana en la muestra problema.

RESULTADOS: se obtuvieron 3 ADN estándar a partir del clonaje de un fragmento del gen ORF26 del herpesvirus humano 8 en un vector (ADN plasmídico), con la utilización de productos purificados de reacción en cadena de la polimerasa y el empleo de ADN genómico de la línea celular BCBL. Se pudieron construir las curvas patrón a partir de cada uno de los ADN estándar obtenidos, los que mostraron una fuerte correlación lineal ($r = -1$) y valores muy bajos de error a lo largo de 6 magnitudes de concentración de ADN diana. El límite inferior de detección a partir del ADN plasmídico y de los productos de reacción en cadena de la polimerasa fue de hasta 100 copias, mientras que con el ADN genómico fue de hasta 10 copias; este último sistema resultó el más sensible.

CONCLUSIONES: la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real normalizada a partir de los 3 ADN estándar probó ser un sistema rápido, específico y altamente sensible que permitirá un mejor diagnóstico y además desarrollar estudios sobre la patogenia de la infección por el herpesvirus humano 8 en Cuba.

Palabras clave: herpesvirus humano 8, sarcoma de Kaposi, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, Cuba.

ABSTRACT

OBJECTIVE: to standardize a real-time polymerase chain reaction system to determine the human herpes virus 8 viral load in several samples from patients suspected of this type of infection.

METHODS: three internationally known methods were evaluated to obtain standard DNA in standard external curve constructions, which allow determining the number of target DNA copies in the suspected samples.

RESULTS: three standards DNA were obtained from cloning ORF26 gene fragment of human herpesvirus 8 in a vector (plasmid DNA), with the use of purified polymerase chain reaction products and of genomic DNA of BCBL cell lines. The pattern curves were constructed on the basis of each of the resulting standard DNA, which showed strong linear correlation ($r = -1$) and very low error values throughout 6 target DNA concentrations. The lower detection limit based on plasmid DNA and the polymerase chain reaction products was 100 copies, whereas that obtained with genomic DNA reached up to 10 copies; this last system turned to be the most susceptible.

CONCLUSIONS: real-time polymerase chain reaction system, standardized for the three standard DNA proved to be a rapid, specific and highly sensitive system for better diagnosis, and for the development of studies on the pathogenesis of human herpesvirus 8 infection in Cuba.

Key words: human herpes virus 8, Kaposi's sarcoma, real-time polymerase chain reaction, Cuba.

INTRODUCCIÓN

La determinación de la carga viral ha constituido un paso crucial, tanto para la interpretación de los mecanismos patogénicos de múltiples infecciones virales como en el monitoreo de la respuesta terapéutica. Representa uno de los mejores sistemas para el diagnóstico de la infección activa, especialmente cuando se realiza en fluidos orgánicos.¹ Asimismo, constituye un marcador esencial en el estudio de la infección causada por los herpesvirus, en contraste con el escaso significado clínico que tiene la determinación del título de anticuerpos (Acs) en la infección por patógenos latentes.²

En la actualidad se reconoce el papel patogénico del herpesvirus humano 8 (Hvh-8) en todas las variantes clínico-epidemiológicas del sarcoma de Kaposi (clásico, endémico, iatrogénico y epidémico), así como su participación en la génesis del linfoma de efusión primario (LEP) y en la enfermedad multicéntrica de Castleman (EMC).³ Por causa de las discrepancias en los resultados obtenidos en diferentes estudios, uno de los desafíos más importantes que enfrentan los investigadores que se dedican al estudio de este agente, es la obtención de un método diagnóstico validado, que favorezca la comprensión de la infección causada por este virus en diversas zonas geográficas. Se ha planteado que este método representará un paso crítico, tanto para el control de su transmisión como para lograr una mejor interpretación de los resultados alcanzados. En este sentido, *Parisi* y otros en 2007 propusieron la determinación de la carga viral como el mejor medio para el pesquisaje de la infección por el Hvh-8 en la sangre de donantes.⁴

En la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR), los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo de reacción sin necesidad de manipulación posterior; se elimina el riesgo de liberación al ambiente de ácidos nucleicos amplificados que son responsables de contaminaciones en la RCP convencional. El principio de esta herramienta se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET: siglas del inglés *fluorescence resonance energy transfer*) entre 2 fluorocromos adyacentes. Uno de los fluorocromos opera como donador (del inglés *reporter*) emitiendo fluorescencia y el segundo fluorocromo puede actuar como aceptor (del inglés *quencher*) absorbiendo la energía del primero, o también funcionar como segundo donador emitiendo la energía absorbida del primer donador a una longitud de onda diferente.⁵

Se han implementado 2 estrategias para la cuantificación mediante RCP-TR, una permite la cuantificación relativa y con la otra se logra una cuantificación absoluta. En la cuantificación relativa se emplean varios modelos matemáticos que permiten conocer el grado de expresión de un gen específico, al comparar su nivel de expresión con el de un gen de referencia. Por el contrario, mediante la cuantificación absoluta se logra conocer el número de copias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en la muestra problema, al compararse con estándares establecidos. Para la puesta en marcha de este último método, se utilizan diluciones seriadas de ADN estándar con concentración conocida, que se emplean para la construcción de una curva estándar o patrón contra la que se comparará la fluorescencia detectada en la muestra que se analiza. Numerosas estrategias se han utilizado para obtener estos estándares, entre los que se han informado están el clonaje del gen de interés en un vector, el ADN genómico, los productos purificados de RCP, cepas de virus cultivables con títulos conocidos o el empleo de oligonucleótidos sintéticos.⁶

Hasta el momento, Cuba no contaba con técnicas cuantitativas para el diagnóstico y monitoreo de la infección por el Hvh-8 en pacientes infectados con este virus. Por tanto, el colectivo de autores se propuso normalizar una RCP-TR para determinar la carga viral de este herpesvirus a través de la plataforma *LightCycler* y, de esa forma, introducir esta herramienta diagnóstica en el laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del Departamento de Virología del Instituto de Medicina

Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Con la finalidad de identificar el método idóneo para la cuantificación del Hvh-8, se evaluaron 3 de los reportados internacionalmente para la construcción de la curva estándar.

MÉTODOS

Preparación de los estándares para RCP-TR

Se procedió a obtener ADN estándar por 3 vías: clonaje de un fragmento del gen ORF26 del Hvh-8 en un vector,⁷ productos purificados de RCP de este mismo fragmento⁸ y ADN genómico de la línea celular BCBL (BCBL: siglas del inglés *Body Cavity-Based Lymphoma*) que se encuentra infectada de forma latente con el Hvh-8.⁹

Obtención del ADN plasmídico (ADNp): el fragmento de 111 pb del gen ORF26 que se amplificó mediante RCP cualitativa se insertó en el vector *pTARGET™* (PROMEGA, EUA) y, posteriormente, fue clonado en células electrocompetentes *XL blue*. De las posibles colonias transformantes que aparecieron, se seleccionaron al azar 20 colonias blancas para ser sembradas en placas de LB sólido con ampicilina. Al día siguiente, se les realizó extracción del ADN a los clones recombinantes, para eso se utilizó la metodología descrita en el estuche de purificación de ADNp *Miniprep* (Promega, EUA). La calidad del ADNp extraído fue determinada mediante corrida electroforética en gel de agarosa 0,8 % en TBE 1x. Para determinar las posibles colonias recombinantes, se realizó RCP cualitativa del gen ORF26 a 10 de las 20 colonias transformantes seleccionadas, con el mismo protocolo que se empleó para la obtención del fragmento de 111 pb del ORF26 del Hvh-8. Posteriormente, se determinó la concentración del ADNp extraído de una de las colonias recombinantes en espectrofotómetro (*GeneQuant II, Pharmacia Biotech, EUA*) a una densidad óptica (DO) de 260 nm.

Obtención de los productos de RCP del gen ORF26: 5 µL de ADN previamente extraído de la línea celular BCBL se sometieron a RCP cualitativa, para amplificar un fragmento de 111 pb del gen ORF26 del Hvh-8 con el empleo de los cebadores reportados por *Watzinger* y otros.⁷ La mezcla de la reacción contenía: 10 mM de tampón de RCP; 25 mM de MgCl₂; 25 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado; 10 pmol de cada cebador (sentido positivo y sentido negativo) y 2,5 U de enzima Taq polimerasa (*Amplitaq, Roche*). Los ciclos de amplificación se programaron de la forma siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min; seguido de 40 ciclos de repeticiones de 94 °C por 1 min, 52 °C para la hibridación por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. Mediante el protocolo de Purificación *MiniElute™ Purification Kit* (*Qiagen, EUA*) se purificaron los productos de RCP siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se determinó su concentración en espectrofotómetro (*GeneQuant II, Pharmacia Biotech, EUA*) a una DO de 260 nm.

Obtención de ADN genómico (ADNg): 200 µL de la línea celular BCBL fueron sometidos a extracción de ADNg por el estuche comercial *QIAamp® DNA Mini Kit* (*QIAGEN, EUA*), según las indicaciones del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 100 µL de tampón de elusión y se determinó su concentración en espectrofotómetro (*GeneQuant II, Pharmacia Biotech, EUA*) a una DO de 260 nm.

Cuantificación de los ADN estándares por RCP-TR: se determinó el número de copias de cada uno de los estándares obtenidos en equipo el *LightCycler 1.5* (*Roche Diagnostics, Alemania*). Para ello se añadieron por triplicado 2 µL de cada estándar a capilares que contenían una mezcla compuesta por 3 µL de H₂O, 4 µL de mezcla

universal de RCP (*Roche Diagnostics*, Alemania), 300 nM y 200 nM de oligonucleótidos y sonda, respectivamente. La secuencia de los cebadores y de la sonda fue reportada previamente por *Watzinger* y otros,⁷ pero a diferencia del marcaje con TAMRA (carboxitetrametilrodamina) en el extremo 3' utilizado por estos autores, la sonda empleada en el presente estudio posee un ligando del surco menor en el extremo 3' (MGB: siglas del inglés *minor groove binder*). Los parámetros del ciclaje fueron los siguientes: 95 °C por 10 min y 50 ciclos compuestos por: 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min y 72 °C durante 1 s.

Conocido el punto de corte (Cp) de cada uno de los ADN estándares, se procedió a importar la curva externa patrón previamente construida con el estuche comercial *artus®CMV LC PCR kit* (*Roche Diagnostics*, Alemania; rango de detección: 10⁴ - 10 copias/μL). Para la construcción de esta curva se siguieron las instrucciones del fabricante y se empleó el método de la derivación secundaria máxima (SDMM: siglas del inglés *second derivative maximum method*) de la versión 3.3 del programa del *LightCycler*.

Confección de las curvas estándares

Una vez conocido el número de copias de los diferentes estándares obtenidos (ADNp, productos purificados de RCP y ADNg) se procedió a la confección de 3 curvas estándares a partir de cada uno de ellos. Para esto se realizaron diluciones seriadas en base 10 en H₂O libre de ARNasa-ADNasas de los 3 productos (desde 10⁶ copias de virus/μL hasta 10 copias de virus/μL). Se añadieron 3 réplicas de cada una de las diluciones de los productos estándares a capilares que contenían 15 μL de una mezcla formada por: 3 μL de H₂O, 4 μL de mezcla universal de RCP (*Roche*), 300 nM y 200 nM de oligonucleótidos y sonda, respectivamente. Los parámetros del ciclaje fueron los siguientes: 95 °C por 10 min y 50 ciclos compuestos por 95 °C durante 15 s, 60 °C por 1 min y 72 °C durante 1 s. Al finalizar el último ciclo, por medio de análisis de regresión lineal, el programa del *LightCycler* produce un gráfico de la curva estándar en el que relaciona la concentración logarítmica (eje x) con el Cp de cada uno de los estándares (eje y), con 95 % de intervalo de confianza. Cada uno de los ADN estándares obtenidos fueron trabajados por separado en días diferentes. En el presente estudio se utilizaron los valores medios de los Cp de cada una de las réplicas para la construcción de las curvas externas estándares, con empleo del modo aritmético del método SDMM del programa del *LightCycler* (versión 3.3). Posteriormente, se exportaron y archivaron las curvas en el equipo.

Análisis estadístico

Para la selección del mejor método para determinar la carga viral del Hvh-8 se tuvieron en cuenta varios parámetros, algunos de ellos se calculan de manera automática por el programa del *LightCycler* (versión 3.3), dentro ellos están:

Pendiente de la curva (Slope): se utiliza para evaluar la eficiencia de la reacción. Según las recomendaciones del fabricante para lograr una eficiencia de la curva estándar entre 1,5 y 2,2, su valor debe estar entre 5,7 y 2,9.

Error: señala las variaciones entre capilar y capilar (ejemplo, por errores al pipetear). Un valor de 0,6 corresponde a una desviación del valor x (concentración) de hasta 50 %.

Intercepto (Intercept): se utiliza para evaluar la sensibilidad de la reacción de la RCP-TR, mientras menor sea el valor del Cp en la ecuación de regresión mayor será la sensibilidad del sistema.

r: coeficiente de regresión. Ofrece un control de la adecuada distribución lineal de la curva. Señala posibles errores sistemáticos (*ejemplo*, error acumulado en las diluciones seriadas).

También se estableció el límite de detección de la RCP-TR normalizada, se identificó la última dilución en la que el sistema fue capaz de detectar el ADN diana en el mismo Cp para 100 % de todas las réplicas. Además, para evaluar la especificidad del ensayo y descartar posibles falsos positivos se sometió a amplificación el ADN previamente extraído de 3 cepas: citomegalovirus humano (CMVh; AD169, ATCC), virus de la varicela zoster (VVZ; aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK) y virus del herpes simple 2 (VHS-2, aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK).

RESULTADOS

A través del presente estudio se obtuvieron 3 tipos de ADN estándares. En primer lugar, se logró satisfactoriamente el clonaje del gen ORF26 en el vector *pTARGETTM* en células electrocompetentes *XL blue*. Por medio de la RCP cualitativa del gen ORF26 realizado al ADNp de 10 colonias transformantes seleccionadas se comprobó que en 9 de ellas se amplificó el fragmento clonado del genoma del Hvh-8 ([Fig. 1A](#)), por lo que el porcentaje de positividad de las colonias recombinantes fue de 45 %. El ADNp purificado de una de las colonias tuvo una DO de 0,044 (22 ng de ADN/ μ L) y por medio de RCP-TR se determinó que su número de copias fue de $3,7 \times 10^7$ copias/ μ L.

Se obtuvieron además los productos purificados de RCP del gen ORF26 ([Fig. 1B](#)) con una DO de 0,016 (40 ng ADN/ μ L) y mediante RCP-TR se identificó que tenía $5,5 \times 10^9$ copias/ μ L. Por último, se lograron obtener $4,7 \times 10^6$ copias/ μ L de ADNg de la línea celular BCBL para utilizar como ADN estándar (DO= 0,040 [20 ng de ADN/ μ L]).

Los resultados de la corrida de los ADN estándares en la RCP-TR mostraron una fuerte correlación lineal ($r = -1$), con valores muy bajos de error a lo largo de 6 magnitudes de concentración de ADN diana en cada una de las curvas estándares construidas ([Fig. 2](#)). Con esto se denota la confiabilidad de los 3 estándares obtenidos y su utilidad para ser empleados en la cuantificación del Hvh-8 en diferentes muestras clínicas.

Cuando se evaluó el límite inferior de detección del sistema de RCP-TR normalizado, se encontró que con las curvas estándares construidas a partir del ADNp y de los productos purificados de RCP el sistema, fue capaz de detectar hasta 100 copias en 100 % de las réplicas en la dilución que contenía 10^2 copias/ μ L. Por el contrario, con la curva estándar construida a partir del ADNg se estableció un límite de detección de hasta 10 copias, pues se detectó el mismo valor de Cp en las 3 réplicas de esta concentración ([Fig. 3](#)).

La RCP-TR normalizada probó ser muy específica para la cuantificación del Hvh-8, porque no se detectó un incremento por encima del umbral de fluorescencia en los capilares que contenían ADN extraído de las cepas de CMVh, VHS-2 y VVZ.

DISCUSIÓN

Uno de los pasos fundamentales para lograr la puesta en marcha de la RCP-TR es la obtención de los productos estándares. Hasta el momento no se cuenta con ADN estándares universales que permitan estandarizar este sistema al nivel mundial. Es por ello que la inmensa mayoría de los ensayos que se han diseñado se normalizan en los laboratorios encargados del diagnóstico, a los que se les reconoce en la literatura como RCP-TR caseros.¹⁰ Según han planteado *Watzinger* y otros, estos métodos son la única alternativa con la que se podrá contar en un futuro próximo para la cuantificación de muchos agentes de relevancia clínica.¹¹

De esta forma, los 3 productos obtenidos en el presente estudio representan una importante fuente reproducible de ADN estándar para la puesta en marcha de la RCP-TR en el laboratorio de ITS del IPK, en Cuba. Algunos autores han señalado que la producción de productos estables para la cuantificación por RCP-TR es un proceso muy difícil, tanto por el tiempo que consume su producción como por la dificultad en su cuantificación.¹² No obstante, los métodos de obtención de ADN estándar empleados en el presente estudio han sido utilizados por otros autores.⁷⁻⁹

Históricamente, las curvas estándar han sido el método de elección para determinar la concentración absoluta de ADN. *Larionov* y otros han afirmado que cuando se utilizan buenas prácticas de laboratorio es fácil obtener curvas estándares de suficiente calidad, siempre que se incluya un adecuado número y rango de diluciones de productos estándares.¹³ No obstante, algunos autores han cuestionado la posibilidad de utilizar curvas estándares externas en la cuantificación por RCP-TR porque, según ellos, este método sufre de variaciones intercapilares que son incontrolables y no monitoreables.¹⁴ Sin embargo, *Niesters* en 2001 demostró la existencia de pocas variaciones en los parámetros de las curvas estándares, construidas durante 55 corridas sucesivas para la determinación de la carga viral del CMVh.¹⁵ En concordancia con ello, *Kuhne* y *Oschmann* demostraron la factibilidad de importar las curvas estándares en diferentes corridas realizadas con equipos *LightCycler*.¹⁶

No existe hasta el momento un método consenso para la evaluación de las curvas estándar. El método que con mayor frecuencia se utiliza para evaluar la eficiencia de la RCP-TR se basa en el valor de la pendiente de la curva estándar.¹⁷ Se ha señalado por varios autores que el valor ideal de eficiencia se logra cuando este parámetro es igual a 3,33.¹⁸ Por otra parte, algunos autores han descrito que la sensibilidad de la RCP-TR puede evaluarse por medio del valor del intercepto de la curva estándar, para esto recomiendan que en la medida en que el valor de este parámetro sea menor, se logra una mayor sensibilidad.¹⁹⁻²¹

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se decidió evaluar las curvas estándares construidas sobre la base del valor de la pendiente de la curva y del intercepto. De esta forma, se puede plantear que la curva patrón obtenida a partir del ADN_g mostró una mayor sensibilidad, pues con ella se obtuvo el menor valor de intercepción (Fig. 2). Sin embargo, con la curva construida a partir de los productos de RCP y la del ADN_g se obtuvieron los valores más cercanos al valor de la pendiente de la curva, que se ha reportado por otros autores como de máxima eficiencia de amplificación (*pendiente de la curva* -3,33).¹⁸

Se ha descrito por varios autores que concentraciones muy bajas o muy altas de productos estándares pueden afectar la relación lineal del Cp en la curva estándar. Es por ello que *Ellison* y otros han recomendado que en la construcción de una curva estándar se incluyan solo aquellos estándares en los que todas las réplicas posean un valor detectable por el sistema, así se evita el problema inherente al trabajo con soluciones de baja concentración de ácidos nucleicos.²² Además, *Niesters* en 2001 planteó que con una concentración inferior a 1 000 copias, es

cuestionable cómo una diferencia de 10 veces este valor tenga cierta importancia clínica.¹⁵

Al comparar los diferentes parámetros de las curvas estándares construidas en el presente trabajo con los obtenidos por los autores del protocolo original,⁷ se encontró que los valores más cercanos en la eficiencia de la reacción y el coeficiente de regresión alcanzados por estos investigadores (*pendiente de la curva* = - 3,547, *r* = 0,999) se lograron con la curva construida a partir del ADN_g (*slope* = - 3,528; *r* = -1) (Fig. 1). Sin embargo, con nuestra curva se logró una mayor sensibilidad (*intercepto* = 35,15) en comparación con el valor de intercepción obtenido en la curva estándar de estos autores (*intercepto* = 39,34). Esta diferencia se pensó que se deba al efecto del marcaje con el MGB en el diseño de la sonda, que según se ha reconocido por varios autores garantiza una unión mucho más específica y estable a la secuencia del ADN diana.²³ Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con esta curva estándar y por permitir detectar un menor número de copias de secuencias dianas (10 copias de ADN), se decidió seleccionar el ADN_g como ADN estándar para cuantificar el Hvh-8 en diferentes muestras clínicas de pacientes con sospecha de infección por este herpesvirus.

El hecho de que no se detectara fluorescencia en los capilares que contenían ADN extraído de las cepas de CMVh, VHS-2 y VVZ justifica lo planteado por los autores que diseñaron la sonda y los cebadores utilizados para normalizar este sistema de RCP-TR, quienes demostraron que estos no poseían reactividad cruzada con el genoma de ningún otro patógeno ni con alguna secuencia de ADN humano.⁷

Por todos los resultados obtenidos y en concordancia con lo reportado por diferentes autores que han utilizado la plataforma *LightCycler*,^{18,24} se pudo normalizar un sistema de RCP-TR rápido, específico y altamente sensible para la cuantificación del Hvh-8. La incorporación de este sistema al flujograma diagnóstico del Laboratorio de ITS del Departamento de Virología del IPK significará en un salto cualitativo, no solo para el diagnóstico de la infección por este herpesvirus, sino también en el monitoreo de la respuesta terapéutica. Además se podrá emplear en estudios sobre la patogenia de la infección por este virus oncogénico.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Ulrich Hengge de la Universidad de Düserdolf, Alemania, por la donación del equipo *Lightcycler 1.5* al Departamento de Virología del IPK.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakker NA, Verschuuren EA, Veeger NJ, van der Bij W, van Imhoff GW, Kallenberg CG, et al. Quantification of Epstein-Barr virus-DNA load in lung transplant recipients: a comparison of plasma versus whole blood. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(1):7-10.
2. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, et al. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1426-32.

3. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(5):281-92.
4. Parisi SG, Cruciani M, Palu G. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2007;356(1):87-9.
5. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):165-256.
6. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29(3):151-9.
7. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5189-98.
8. Rose'Meyer RB, Mellick AS, Garnham BG, Harrison GJ, Massa HM, Griffiths LR. The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2003;11(1):9-18.
9. Yun JJ, Heisler LE, Hwang, II, Wilkins O, Lau SK, Hycza M, et al. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(12):85.
10. Speers DJ. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev*. 2006;27:39-51.
11. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):254-98.
12. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla,CA, USA: IUL; 2004. p. 1-20.
13. Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:62.
14. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(6):1292-305.
15. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 2001;25(4):419-29.
16. Kuhne BS, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques*. 2002;33(5):1078-84.
17. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):897-901.

18. Gulley ML, Fan H, Elmore SH. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr virus quantification reagents in a clinical laboratory setting. *J Mol Diagn.* 2006;8(5):589-97.
19. Saikaly PE, Barlaz MA, de Los Reyes FL, 3rd. Development of quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of surrogate biological warfare agents in building debris and leachate. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(20):6557-65.
20. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
21. Bernard PS, Wittwer CT. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry.* 2002;48(8):1178-85.
22. Ellison SL, English CA, Burns MJ, Keer JT. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2006;6:33.
23. Durtschi JD, Stevenson J, Hymas W, Voelkerding KV. Evaluation of quantification methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays. *Anal Biochem.* 2007;361(1):55-64.
24. Dijkstra D, Leurs R, Chazot P, Shenton FC, Stark H, Werfel T, et al. Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H4 receptor. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(2):300-7.

Recibido: 4 de febrero de 2009.

Aprobado: 18 de marzo de 2009.

Dra. *Vivian Kourí Cardellá*. Laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual, Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2, Lisa. AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 5372046051. Teléf.: 537-202 04 50. Correo electrónico: vkouri@ipk.sld.cu