



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA**



**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON
INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19**

**Trabajo de Investigación
presentado como requisito para
aprobar la Asignatura por:
Br. Arvelaez Merlys
Br. Bersovine Ana**

La Morita, Octubre 2012



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA**



**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON
INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19**

**Trabajo de Investigación presentado como
requisito para aprobar la Asignatura por:
Br. Arvelaez Merlys
Br. Bersovine Ana
Tutoras Científicas: Lic. Ana María Urquiolla F.
Dra. Sleygh Castillo
Tutora Metodológica: Profa. Argelia Celis**

La Morita, Octubre 2012



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



La Morita, 15 de Octubre del 2012

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor científico del trabajo titulado: **Inmunidad humoral en pacientes con infección aguda por Parvovirus B19**, el cual es presentado por las Bachilleres Merlys Arvelaez y Ana Bersovine, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.

Nombre y Apellido

C.I



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
SEDE ARAGUA**



VEREDICTO

Nosotros, los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Bioanálisis, con el objeto de evaluar la Tesis de pregrado titulada: “Evaluación de la inmunidad humoral en pacientes con infección aguda por Parvovirus B19”, presentado por las bachilleres Merlys Arvelaez, C.I. 18.702.460 y Ana Bersovine, C.I. 20.694.359, con el fin de obtener el título de Licenciada en Bioanálisis. Después de la exposición y discusión pública del citado Trabajo de Investigación de pregrado, consideramos que el mismo reúne los requisitos para aprobarlo como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta a los 31 días del mes de Octubre de 2012, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actúo como Coordinadora del Jurado, la Tutora Metodológica Profa.

**Nombres y Apellidos
Cédula de Identidad
Tutora Científica**

**Nombres y Apellidos
Cédula de Identidad
Jurado Evaluador**

**Nombres y Apellidos
Cédula de Identidad
Coordinadora del Jurado**

La Morita, Octubre 2012

DEDICATORIA

A Dios

Por haber hecho posible la realización de este trabajo, por abrirnos puertas para poder cumplir esta meta y por su amor infinito e incondicional.

A nuestros padres

Por habernos apoyado incondicionalmente en todo momento, por sus consejos, por el amor y la motivación constante que nos brindaron.

A nuestra tutora científica

Licenciada Ana María Urqiola Fadull por haber confiado en nosotras, por la comprensión, dedicación, consejos, apoyo y animo que nos brindó en todo momento.

A nuestra Tutora Metodológica

Profesora Argelia Celis, por su constante guía durante el desarrollo del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Teresa Noguera

Directora del Banco de Sangre del Centro Médico Maracay, por su colaboración en la recolección de muestras de donantes de sangre que participaron en este estudio como pacientes controles.

A nuestros Padres

Por financiar parte de esta investigación y por lo tanto hacerla posible.

A nuestra Tutora Científica

Por su gran apoyo y colaboración en parte del financiamiento de la investigación.

INDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	PP xi
LISTA DE TABLAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1-10
Objetivo General.....	11
Objetivos Específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Tipo de investigación.....	12
Población y Muestra.....	12
Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	13
Procedimiento experimental.....	13
Obtención de la muestra.....	13
Determinación cuantitativa de anticuerpos IgM anti-PVB19.....	14-15
Determinación cuantitativa de inmunoglobulinas séricas totales IgG e IgA.....	16
Determinación de IgM (inmunoglobulina sérica total) y componentes del complemento (C3 y C4).....	16-17
Análisis de datos.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Resultados.....	18-23
Discusión.....	24-36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
Conclusiones.....	37
Recomendaciones.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39-42
ANEXOS	43
A. Consentimiento informado.....	43-46
B. Ficha de Recolección de datos.....	47

LISTA DE FIGURAS

Nº		PP
1.	Esquema de la replicación de Parvovirus B19.....	4
2.	Evolución clínica virológica e inmunológica tras la infección aguda por Parvovirus B19 en personas inmunocompetentes.....	5
3.	Niveles de inmunoglobulinas séricas totales (mg/dL) en controles sanos y pacientes con infección activa por PVB19.....	20
4.	Distribución de los niveles de inmunoglobulinas séricas totales de controles y pacientes con infección aguda por PVB19.....	21
5.	Niveles de C3 y C4 (mg/dL) en pacientes controles y pacientes con infección activa por PVB19.....	22
6.	Distribución de los niveles de componentes del complemento de controles y pacientes con infección aguda por PVB19.....	23

LISTA DE TABLAS

Nº	PP
1. Manifestaciones clínicas más frecuentes de los pacientes con infección aguda por PVB19.....	19

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA**

**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON
INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19**

**Bachilleres: Merlys Arvelaez
Ana Bersovine**

**Tutoras Científicas: Lic. Ana Ma. Urquiola Fadull
Dra. Sleygh Castillo**

Tutora Metodológica: Profa. Argelia Celis

RESUMEN

Las infecciones por Parvovirus B19, cursan con una amplia variedad de manifestaciones clínicas, cuya gravedad dependen del estado inmunológico y hematológico del paciente. La manifestación típica es el eritema infeccioso, aunque pueden aparecer otros trastornos que van desde una oligoartritis hasta una crisis aplásica. Es por ello que se evaluó el estatus de la inmunidad humoral en 15 pacientes que resultaron positivos a IgM anti-PVB19 por el método de ELISA, cuantificando niveles de inmunoglobulinas séricas totales (IgM, IgA e IgG) y componentes del complemento (C3 y C4) a través de nefelometría e inmunodifusión radial. También se identificaron las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes positivos. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por un grupo control que estuvo conformado por 20 donantes de sangre asintomáticos. Se encontraron dos casos positivos en donantes asintomáticos. Las manifestaciones clínicas más frecuentes identificadas en este estudio en pacientes con infección aguda por PVB19 fueron: artralgias, anemias, infertilidad, abortos y alteraciones en subpoblaciones linfocitarias. Además en los pacientes positivos se presentó una tendencia a mayor concentración de Inmunoglobulinas séricas totales (IgM, IgA, IgG) con respecto al grupo control, haciéndose más evidente para IgM. Esta misma tendencia fue hallada para los componentes del complemento C3 y C4, haciéndose más evidente para C3.

Palabras claves: Parvovirus B19, inmunidad humoral, eritema infeccioso, quinta enfermedad.

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA**

**EVALUATION OF IMMUNITY HUMORAL IN PATIENTS WITH INFECTION
ACUTE BY PARVOVIRUS B19**

**Bachilleres: Merlys Arvelaez
Ana Bersovine**

**Tutoras Científicas: Lic. Ana Ma. Urquiola Fadull
Dra. Sleygh Castillo**

Tutora Metodológica: Profa. Argelia Celis

ABSTRACT

Parvovirus B19 infections, present with a wide variety of clinical manifestations, the severity of which depends on the immune status of the patient and hematology. The typical manifestation is fifth disease, although there may be other disorders ranging from oligoarthritis to aplastic crisis. That is why we evaluated the status of humoral immunity in 15 patients who were positive for anti-PVB19 IgM by ELISA method, quantifying levels of total serum immunoglobulins (IgM, IgA and IgG) and complement components (C3 and C4) by nephelometry and radial immunodiffusion. We also identified the clinical manifestations presented positive patients. These results were compared with those of a control group that consisted of 20 asymptomatic blood donors. We found two positive cases in asymptomatic donors. The most common clinical manifestations identified in this study in patients with acute PVB19 were: arthralgia, anemia, infertility, abortions and alterations in lymphocyte subpopulations. Also in positive patients showed a trend towards greater concentration of total serum immunoglobulins (IgM, IgA, IgG) compared to the control group, becoming more evident for IgM. The same trend was found for complement components C3 and C4, becoming more apparent to C3.

Key words: Parvovirus B19, humoral immunity, erythema infectiosum, fifth disease.

INTRODUCCIÓN

El Parvovirus B19 (PVB19) se ha designado como tal desde su descubrimiento en el año 1975, sin embargo, recientemente se ha sugerido un cambio de denominación y ha pasado a ser clasificado como *Erythrovirus B19*, debido a su especial atracción por los precursores eritroides (Tapia y cols., 2005). Pertenece a la familia Parvoviridae, género *Erythrovirus* y es el único miembro de esta familia que causa enfermedad en humanos (Coon, 2003). Es un virus ADN monocatenario, de aproximadamente 26 nm de diámetro, con un genoma de 5-6 kb, no presenta envoltura, pero si una cápside icosaédrica, la cual posee una proteína estructural de 83 kDa (VP1) y otra de 58 kDa (VP2), la primera representa el 4% mientras que la segunda el 96% del total de la cápside (Tapia y cols., 2005).

El virus presenta una proteína no estructural denominada NS1. Esta actúa como un trans-activador transcripcional, regula promotores víricos como el P6 (crucial para la replicación viral) y promotores celulares como interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), el factor nuclear kappa potenciador de las células activadas B (FN- $k\beta$) y el supresor tumoral p53. La proteína NS1, también induce la secreción de citoquinas proinflamatorias, lo que podría ser la causa de inflamación y daño celular observado en los enfermos con artritis y otras enfermedades inflamatorias autoinmunes relacionadas a PVB19. Además la NS1 también es capaz de influir en las vías de señalización en la respuesta antivírica (Espinoza, 2009).

El Antígeno P, es el receptor celular para el PVB19 y está presente en megacariocitos, células endoteliales y en los miocitos fetales; sin embargo, ninguno de estos tipos celulares ha demostrado ser permisiva para la replicación de PVB19 (Heegaard y Brown, 2002).

La replicación de PVB19 ocurre en las células activamente mitóticas, preferiblemente las del linaje eritroide en la médula ósea, células eritroides del hígado fetal y células de la leucemia eritroide. Luego de adherirse al receptor celular de los eritrocitos, el virus inicia su replicación en las células con la liberación de la molécula de ADN, la cual ingresa al núcleo de la célula. Es importante resaltar, que es necesaria la transcriptasa de los eritroblastos para que el virus pueda iniciar su replicación, así como también los factores de crecimiento presentes durante la fase S (síntesis) del ciclo celular y la enzima ADN polimerasa celular; todos son requerimientos para generar una banda de ADN complementaria. La doble banda de ADN se transcribe y se replica lo que genera ARNm para la producción de proteínas virales no estructurales (NS1) y estructurales (VP1 y VP2) a nivel de citoplasma que posteriormente reingresan al núcleo donde el virión es ensamblado junto al nuevo genoma viral. La membrana nuclear y citoplasmática se generan y el virus es liberado por la lisis celular (Figura 1) (Vélez y cols., 2004).

El sistema inmune es el responsable de la defensa del organismo ante la presencia de algún patógeno. Este responde principalmente a través de la activación de dos mecanismos: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. Ambos mecanismos se encargan de impedir la infección y erradicar las ya establecidas. La respuesta innata está mediada por el IFN tipo I y los linfocitos NK, los cuales se encargan de destruir las células infectadas. En cambio, la respuesta inmunitaria adaptativa depende de los anticuerpos y de los linfocitos T citotóxicos. Los anticuerpos antivíricos

actúan fundamentalmente como neutralizantes para evitar la fijación del virus y su penetración a la célula del huésped, estos anticuerpos neutralizantes se unen a los antígenos de envoltura o cápside del virus, estos sólo son eficaces frente a los virus durante la fase extracelular de su ciclo vital la cual ocurre al principio de la infección. Los linfocitos T citotóxicos combaten la infección mediante la destrucción de células infectadas. La activación del complemento participa asimismo en la inmunidad antivírica mediada por anticuerpos, sobre todo a través de la estimulación de la fagocitosis. La observación de que la resistencia a las partículas víricas suele ser específica del tipo serológico (definido por los anticuerpos) resalta la importancia de la inmunidad humoral en la defensa contra las infecciones vírica, por lo tanto la inmunidad humoral inducida por infección previa puede proteger a las personas frente a una infección vírica, pero no puede por sí sola erradicar una infección ya establecida. (Abbas y cols., 2008)

La principal vía de transmisión del PVB19 es la ruta respiratoria a través de gotas de saliva, sin embargo, también puede transmitirse por medio de transfusiones sanguíneas y hemoderivados, por transplante de órganos sólidos o de células hematopoyéticas y por vía placentaria (Gaggero y cols., 2007). Después de un periodo de incubación de 5 a 15 días, aparecen las primeras manifestaciones clínicas que se caracterizan por fiebre, escalofríos, dolor de cabeza y mialgias, los niveles de reticulocitos caen a cifras indetectables, lo que resulta en una disminución temporal de la hemoglobina pudiendo llegar hasta 1 g/dL, la recuperación se presenta de siete a diez días más tarde. Puede presentarse, además una linfopenia clínicamente significativa, neutropenia y trombocitopenia. En cuanto a la respuesta humoral, los anticuerpos IgM específicos aparecen 10 a 12 días después de la infección y pueden persistir hasta por tres meses. Existe una segunda fase que aparece dos semanas después de la primera y se caracteriza por erupción cutánea, picor y puede estar presente o no la artralgia, en esta fase

aparecen los anticuerpos IgG específicos y persisten de por vida. La IgA también puede ser detectada y probablemente desempeña un papel en la protección contra la infección en la nasofaringe (vía de entrada) (Figura 2) (Heegaard y Brown, 2002).

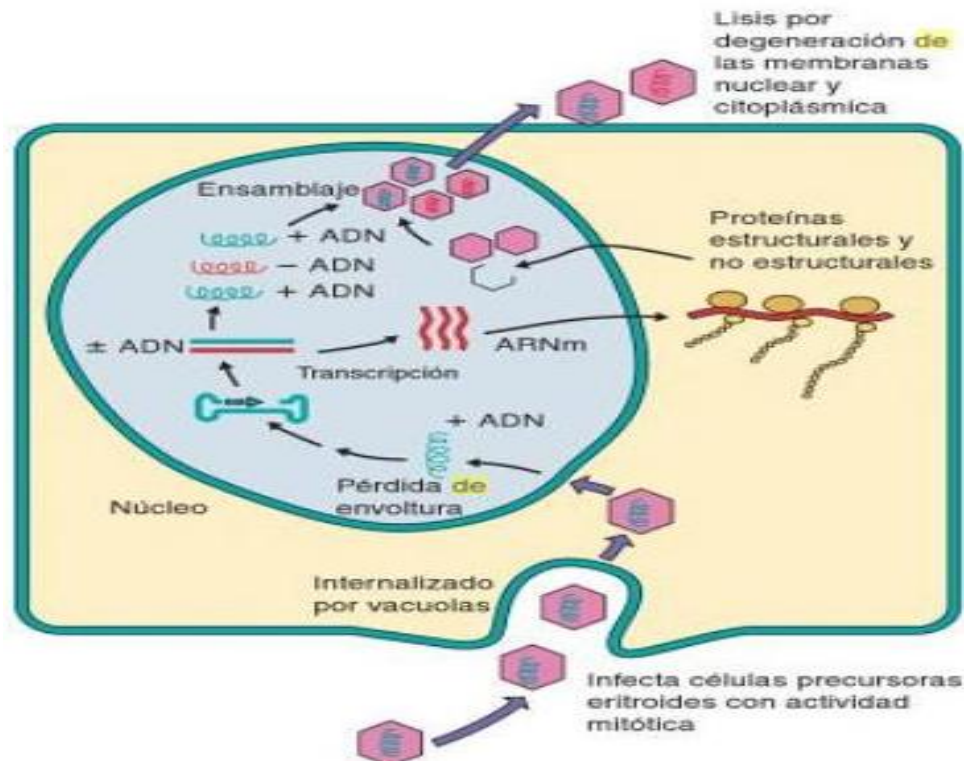


Figura 1. Esquema de la replicación de un PVB19.

Fuente: Murray y cols., 2003

El Parvovirus B19, puede generar serias complicaciones en inmunocomprometidos, gestantes y personas con patologías de base (trastornos hematológicos o inmunitarios). Las manifestaciones clínicas pueden ir desde auto limitadas a graves; ejemplo de ellos son, el eritema infeccioso (quinta enfermedad), poliartropatía, anemia aguda, debido a la crisis aplásica en pacientes con trastornos hemáticos en los cuales el tiempo de vida del eritrocito se ha acortado (pacientes con enfermedades de células falciformes, talasemia, esferocitosis o cualquier otro trastorno en el cual se vea afectada la expresión del gen de hemoglobina o alteraciones de

membrana celular), anemia crónica en pacientes con inmunodeficiencias congénitas, infección por VIH, pacientes sometidos a quimioterapia o trasplante de órganos. Entre otras manifestaciones, se encuentra la *hidrops fetalis* intrauterina la cual puede generar la muerte fetal debido a la infección (Brown, 2002).

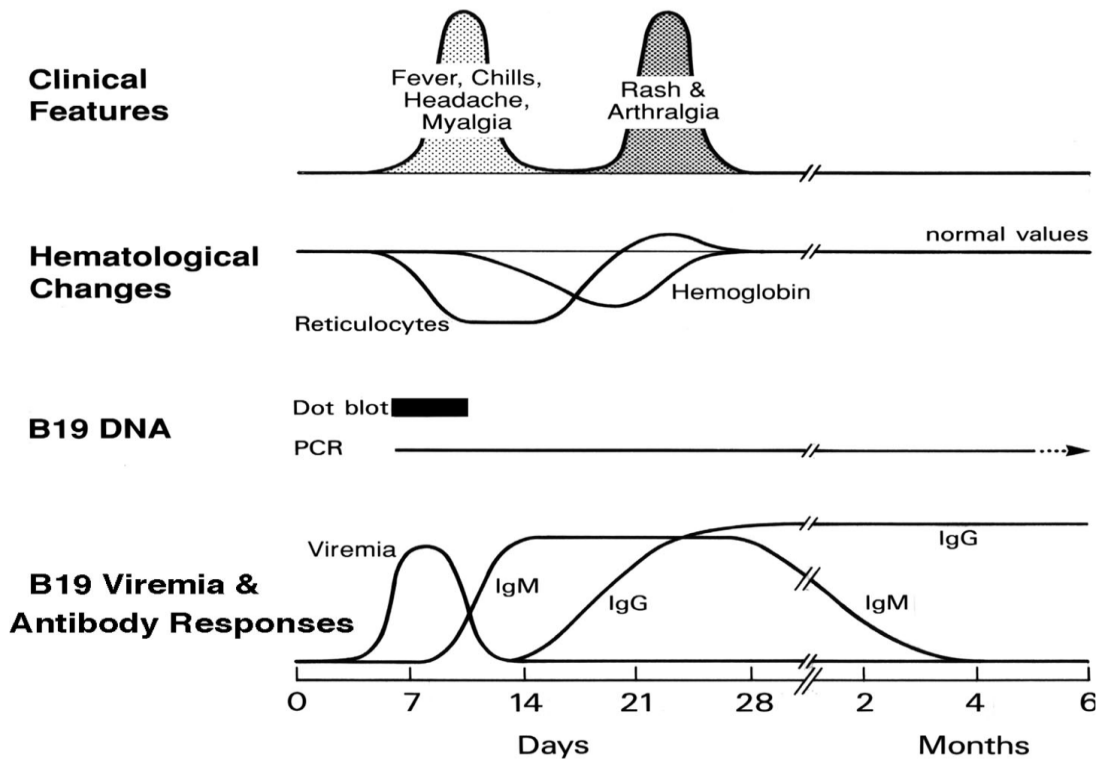


Figura 2. Evolución clínica virológica e inmunológica tras la infección aguda por PVB19 en personas inmunocompetentes.

Fuente: Heegaard y Brown (2002).

El Parvovirus B19 también se ha relacionado con enfermedades renales, y es considerado como una causa de glomerulopatía aguda y de anemia en enfermedad renal terminal o trasplante renal. Dicha relación se ha basado, en hallazgos renales con infección viral, serología positiva, e identificación del genoma viral en el glomérulo. Los mecanismos patológicos, pueden incluir efectos citopáticos sobre las células epiteliales o endoteliales del

glomérulo y la deposición glomerular de complejos inmunes. Los pacientes que requieren diálisis, pueden ser más susceptibles a la anemia aguda y crónica después de la infección por PVB19. Los factores que predisponen a esta población a las complicaciones de la infección por PVB19, incluyen deterioro de la respuesta inmune, la producción deficiente de eritropoyetina, y posiblemente disminución de la supervivencia del eritrocito. Los pacientes con trasplante renal infectados por PVB19, pueden desarrollar viremia persistente como resultado de una respuesta inmune disfuncional; las complicaciones más comunes que presentan son, anemia crónica y aplasia pura de eritrocitos. Este diagnóstico debe ser considerado en los pacientes trasplantados con anemia inexplicable o pancitopenia y con rechazo del aloinjerto (Waldman y Kopp, 2007).

La infección por PVB19 se debe diferenciar de aquellas donde se presenten manifestaciones cutáneas atípicas, por ejemplo, enfermedades como rubéola, escarlatina, exantema súbito y dengue. Los casos eventuales pueden plantear más dificultades en su diferenciación con otros exantemas víricos de la infancia. El carácter purpúrico de algunas lesiones, junto con las posibles manchas de koplik obliga a plantearse el diagnóstico de un sarampión atípico (Galán y Moreno, 2004).

Las infecciones por PVB19 se producen a nivel mundial, y pueden ocurrir en cualquier época del año y de manera esporádica (Coon, 2003). Aproximadamente 2 a 10% de niños de 5 años de edad, han estado expuestos a infección por PVB19. Este porcentaje aumenta de 40% a 60% en adultos de más de 20 años de edad y cerca de 85% en los adultos de edad avanzada. Las infecciones suelen ser más comunes en invierno y en verano con picos epidemiológicos cada tres a cuatro años, en la primera mitad del año (Servant-Delmas y cols., 2010).

El diagnóstico de la infección pocas veces se documenta, por lo que no hay suficientes registros que demuestren que se trate de un problema de salud pública. Sin embargo, en algunos estudios se ha encontrado aumentos en la seroprevalencia.

Kishore y cols. (2011) determinaron la seroprevalencia de PVB19, mediante la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-B19, en pacientes con talasemia mayor, a quienes se les realizaron múltiples transfusiones de sangre. Para este estudio se procesaron 90 muestras de pacientes con beta talasemia mayor, registrados en el Instituto de Atención Terciaria al norte de la India, la técnica aplicada en el estudio fue ELISA, utilizando antígenos de PVB19 (proteínas estructurales VP1 y VP2). De los 90 pacientes con talasemia mayor 37 (41,1%) presentaron anticuerpos IgM anti-PVB19 (indicativos de infección aguda), mientras que 73 (81%) dieron resultados positivos para anticuerpos IgG anti-B19 (indicativos de infección pasada), lo que demuestra que la transfusión de sangre tiene una influencia significativa en el aumento de la prevalencia de la infección por PVB19, en pacientes con talasemia.

Gaggero y cols. (2007), determinaron la presencia de anticuerpos IgG anti-PVB19, en una población de donantes de sangre voluntarios de dos hospitales en Santiago de Chile, para conocer la seroprevalencia de esta infección en esta población en particular. Para el estudio se procesaron 400 muestras de plasma, la técnica empleada fue ELISA, la cual detecta anticuerpos contra la proteína viral recombinante VP1 (usada como antígeno). De las 400 muestras de suero analizadas, 252 pertenecieron al Hospital José Joaquín Aguirre, de éstas solo 141 (56,0%) resultaron positivas para anticuerpos IgG anti-PVB19, por otro lado, del Banco de Sangre Hospital Salvador se procesaron 148 muestras, de las cuales solo 78 (52,7%) fueron positivas para anticuerpos IgG anti-PVB19. La prevalencia

total fue de 58,4%, lo que indica que una gran cantidad de individuos muestran exposición previa al virus.

Isa y cols. (2006) caracterizaron las respuestas de citoquinas proinflamatorias durante la infección aguda por PVB19, para determinar si un desequilibrio del patrón de citoquinas está relacionado con la infección persistente del virus. Las citoquinas se cuantificaron por inmunoensayos como el ELISA y por medio de otras técnicas como la PCR, en el suero de pacientes infectados y controles. Se hizo evidente, en algunos pacientes, niveles elevados de interleucina, (IL)-2, IL-12 e IL-15 en el momento del pico inicial de carga viral durante la infección aguda. Este patrón se ve en la ausencia de un interferón (IFN- γ). Durante el seguimiento (20 a 130 semanas después de la infección aguda) algunos de estos pacientes tenían una respuesta sostenida de citoquinas. A diferencia de pacientes con infección persistente con PVB19, quienes no mostraron un desequilibrio evidente de su patrón de citoquinas, pero si un elevado nivel de IFN- γ . En este grupo de personas, no se diagnosticó ningún tipo de inmunodeficiencia que explique la persistencia viral. En conclusión, los pacientes con infección aguda, demostraron una respuesta de citoquinas Th1 sostenida mientras que los pacientes con infección persistente no presentan un desequilibrio evidente de su patrón de citoquinas a excepción de una elevación de IFN- γ .

La IL-6 es un importante estimulador de la síntesis hepática de reactantes de fase aguda y estimula el crecimiento de linfocitos B (Abbas y cols., 2008), por lo que favorece la hipergammaglobulinemia. Tsay y Zouali (2006) señalan que la proteína no estructural (NS1) producida por PVB19, genera la expresión en la célula huésped de IL-6. La activación de los promotores de citoquinas pro-inflamatorias, puede romper el equilibrio delicado entre la supervivencia celular y la apoptosis, y puede contribuir a la desregulación inmune.

En Venezuela, la prevalencia de la infección por PVB19 y la ocurrencia de los brotes ha sido poco estudiada y la información nacional es escasa. El primer reporte fue realizado por González y cols. (1998) en un estudio llevado a cabo en el Banco de Sangre del Estado Zulia, encontrando 83,3% de IgG anti-PVB19 en pacientes con crisis aplásica, 68,9% en pacientes sin crisis aplásica y 46,6% en pacientes controles, lo cual indica exposición previa al virus. Solo se observó 8,3% de IgM específica indicativa de infección aguda, en pacientes con crisis aplásica. Sin embargo, recientemente en el Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiola Fadull C.A y en Inmunoaragua C.A, en Maracay, estado Aragua se han realizado determinaciones de IgM anti-PVB19 y se ha obtenido desde el año 2006 hasta el año 2010 un total de 550 casos positivos a PVB19, encontrándose que la infección está presente durante todo el año, con un aumento considerable de casos en los meses de enero a abril y de octubre a diciembre (A. Urquiola, comunicación personal, Septiembre 23, 2011).

En la infección aguda por PVB19, cuyo indicador serológico es la IgM anti-PVB19, se produce un estatus de inflamación y disregulación del sistema inmunológico, mediada en parte por la acción de proteínas virales y de citoquinas proinflamatorias como la Interleucina-6 y Factor de Necrosis Tumoral (IL-6, TNF), y la infección crónica puede ocurrir de forma ocasional, precisamente por un fallo en la respuesta inmune humoral, es decir, esta fase crónica de la enfermedad se observa en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales persiste el virus por déficit de los mecanismos inmunológicos necesarios para eliminarlo. En la actualidad no se conoce aún con precisión como se encuentran los niveles totales de inmunoglobulinas séricas durante la infección (A. Urquiola, comunicación personal, Julio 18, 2011). En cuanto a los niveles de los componentes del complemento, Fonseca y cols., (2004) reportaron una disminución de los factores del complemento en infecciones por PVB19 relacionadas a artritis.

Similares a estos resultados fueron los obtenidos en un trabajo de Maestría “Infección por Parvovirus Humano B19 y su asociación con enfermedades autoinmunes” realizado por la Licenciada Ana maría Urquiola Fadull en 2007, en el cual se reportaron niveles disminuidos de C3 en pacientes con enfermedad autoinmune e infección por PVB19.

Por lo mencionado anteriormente, es de interés cuantificar los componentes de la inmunidad humoral en pacientes con infección aguda por PVB19, en busca de elementos que ayuden a dilucidar si la patogenia ocasionada por el virus es el producto de una sobre activación del sistema inmunológico, o si se deben a un estado de inmunosupresión que contribuyen a la persistencia del virus.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Evaluar el estatus de la inmunidad humoral en pacientes con infección aguda por PVB19, que acuden al Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiola Fadull durante el periodo marzo – agosto del año 2012.

- **Objetivos específicos**

- Determinar los niveles de anticuerpos IgM específicos anti-PVB19 en los pacientes en estudio.
- Identificar las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con infección aguda por Parvovirus B19.
- Cuantificar los niveles totales de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) en suero de pacientes con infección aguda por PVB19.
- Cuantificar factores de complemento (C3-C4) en el suero de los pacientes con infección aguda por PVB19.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo descriptiva de corte transversal, ya que se caracteriza inmunológicamente a una población con infección aguda por PVB19 en un periodo de tiempo determinado, comprendido entre el mes de marzo y agosto del año 2012.

Población y muestra

La población estuvo representada por los pacientes que acuden al Laboratorio Inmunoológico “Ana María Urquiola Fadull” C.A. con síntomas y signos clínicos sugestivos de una infección aguda por PVB19 (síndrome de eritema de guantes y calcetines, fiebre y malestar general, rash cutáneo en rostro y antebrazos, anemia, astenia, artralgias). A estos pacientes se les determinaron anticuerpos IgM anti-PVB19, de manera que la muestra quedó conformada por 15 individuos que resultaron positivos a esta prueba.

El grupo control estuvo conformado por 20 donantes de sangre asintomáticos y con IgM anti-PVB19 negativa que asistieron al Banco de Sangre del Centro Médico Maracay entre julio-agosto de 2012.

El muestreo fue de tipo no probabilístico intencional, ya que se seleccionó la muestra en función a criterios de inclusión y exclusión.

- **Criterios de inclusión**
 - Personas mayores de 12 años que acudieron al Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiolla Fadull.

- **Criterios de exclusión**
 - Personas con terapia inmunosupresora
 - Personas con patologías crónicas de base
 - Personas menores de 12 años de edad
 - Individuos que manifestaran infecciones pasadas por: Citomegalovirus, Epstein-Barr y Herpes Virus Simple

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Como instrumentos de recolección de datos, se utilizó una ficha que contenía los datos personales y clínicos del paciente (Anexo B). Los mismos fueron obtenidos en el laboratorio, a través de un interrogatorio realizado por la Licenciada Ana María Urquiola Fadull, aquellos pacientes que resultaron positivos y accedieron a participar en la investigación se les proporcionó un consentimiento informado, en donde se les dio información respecto al estudio (Anexo A).

Procedimiento experimental

Obtención de la muestra

Primeramente se extrajo por punción venosa, 10 mL de sangre de cada paciente, se recolectaron las muestras en tubos sin anticoagulante debidamente identificados con la numeración interna del laboratorio. Para la obtención del suero, la sangre fue centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos, y

éstas fueron mantenidas a una temperatura alrededor de -20 °C hasta su procesamiento.

Determinación cuantitativa de anticuerpos IgM anti PVB19

La determinación cuantitativa de anticuerpos IgM específicos para PVB19 se realizó a través de un inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto marca Demeditec (Demeditec Diagnostics GmbH) en el cual los antígenos recombinantes (proteína estructural VP1) se encuentra adheridos a la microplaca de titulación, mientras que los anticuerpos presentes en la muestra de suero del paciente se enlazan a los antígenos, estos son detectados mediante la adición de anticuerpos anti-inmunoglobulina humana marcados con la enzima peroxidasa (conjugado), la enzima convierte al sustrato incoloro (H_2O_2/TMB) en un producto final de color azul. La reacción enzimática se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico (solución de parada), ocurriendo de forma simultánea un cambio de color de azul a amarillo.

Las muestras se diluyen con en diluyente para muestras contenido en el equipo y adicionalmente se incuban con un absorbente IgG-RF el cual contiene anticuerpos anti-IgG humana, esto con la finalidad de eliminar la inhibición competitiva por parte de las IgG específicas, y eliminar los factores reumatoides. Este pretratamiento elimina resultados falsos positivos y negativos. Se realizó una dilución de la muestra 1:50, usando 500 μ L del diluyente y 10 μ L de la muestra. Luego, esta dilución se diluye a su vez $\frac{1}{2}$ con el absorbente, a saber, 60 μ L de la dilución de la muestra y 60 μ L de buffer absorbente. Esta última se incubó 15 minutos a temperatura ambiente.

Se añade a los micropozos 100 μ L de esta muestra pretratada, igualmente en los pozos correspondientes se añade 100 μ L de control

positivo, control negativo y control cutt off. Se realizó una incubación de 60 minutos a 37 °C. Luego se procedió a realizar cinco lavados con el buffer de lavado y se vació totalmente la placa para posteriormente agregar 100 µL de conjugado a cada pocillo, incubándose nuevamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente cinco lavados, para añadir ahora 100 µL de sustrato, seguidamente se realiza una nueva incubación de 15 minutos a la misma temperatura en oscuridad. Por último se adicionaron 100 µL de solución de parada (solución de ácido sulfúrico 0,4N) en cada pocillo de reacción, se mezcló cuidadosamente y se realizó la lectura a una absorbancia con doble filtro, uno primario de 450 y otro secundario de 630 nm. La lectura de la absorbancia se llevó a cabo en el lector de ELISA Chem-Well modelo 2910.

La obtención de los resultados se realizó a través de un cálculo con el valor cut-off, reportándose los resultados en DU (Dimeditec Units). Los cálculos se realizaron según las recomendaciones del fabricante de la siguiente manera:

$$\frac{Abs\ del\ paciente\ X\ 10}{Abs\ del\ Cut\ off} = [DEMEDIATEC\ UNITS]$$

- Interpretación de los resultados:

Cut Off: 10 DU

Zona de indeterminación: 9-12 DU

Negativo: <9 DU

Positivo: >12 DU

Determinación cuantitativa de inmunoglobulinas séricas totales (IgG e IgA)

Para la determinación se uso un kit de la marca comercial Siemens. Estas se realizaron utilizando la técnica de inmunodifusión radial cuyo principio consiste en añadir la muestra en una placa de gel de agarosa, en la cual se encuentra el anticuerpo específico contra la proteína que se desea determinar (IgG o IgA según sea el caso), que en este caso es el antígeno. Cuando el antígeno difunde por el gel de agarosa se forma un inmunocomplejo que se hace visible por la formación de un anillo de precipitación, donde las concentraciones de antígeno y anticuerpo son similares o equivalentes.

Para la realización de la técnica no se requirió dilución previa de la muestra, y solo se necesitaron 5 μ L de la misma para agregar en los pocillos del agar. La lectura de los resultados se efectuó a las 72 horas, midiéndose el diámetro del anillo y relacionándose estos valores con una tabla incluida en el kit comercial, que contiene el valor de la concentración de acuerdo al diámetro obtenido.

Los valores de referencia para IgA son de 81-387 mg/dL y para IgG son de 800-1800 mg/dL.

Determinación de IgM (inmunoglobulina sérica total) y componentes del complemento (C3 y C4)

Estas determinaciones se realizaron por nefelometría, utilizando kits de la casa comercial The Binding Site Group, en un nefelómetro MININEPH. Esta técnica implica una reacción de la muestra con un antisuero específico para formar complejos insolubles. Cuando un rayo de luz pasa a través de la suspensión formada, una porción de luz es dispersada y detectada por un

fotodiodo. La cantidad de luz dispersada es directamente proporcional a la concentración de proteína específica en la muestra. Para el ensayo se hace una dilución 1/11 de la muestra con diluyente de muestras provisto por la casa comercial. Luego se añade en una cubeta de reacción, un agitador magnético, 10 µl de la dilución, 400 µl de buffer de trabajo y 40 µl de antisuero. El equipo tiene un sensor que detecta cuando es añadida esta mezcla a la cubeta y comienza la lectura, la cual es procesada con un factor interno que viene incorporado en una tarjeta magnética con cada kit. El resultado es expresado en g/L y se convierte matemáticamente en mg/dL.

Los valores de referencia para estas determinaciones son los siguientes:

IgM: 40-263 mg/dL

C3: 89-187 mg/dL

C4: 16,5- 38 mg/dL

Análisis de datos

Se aplicó una estadística descriptiva con el objeto de presentar el grupo de datos por medio de tablas y gráficas. Los datos fueron expresados como media aritmética \pm desviación estándar. El test de correlación de Pearson fue usado para correlacionar las variables. Los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Para el procesamiento de los datos se utilizaron los programas estadísticos SPSS versión 17.0 y Excel de Microsoft Office versión 2007.

RESULTADOS

Se determinaron anticuerpos IgM anti-PVB19 a 45 individuos, de los cuales 22 eran donantes de sangre (pacientes sanos) que formaron parte del grupo control y 23 eran pacientes con sintomatología sugestiva de infección aguda por PVB19, de estos 23 pacientes solo 13 resultaron positivos a IgM anti- PVB19, y de los donantes de sangre, 2 resultaron positivos, por lo cual pasaron a formar parte del grupo de pacientes, quedando la muestra constituida por 15 individuos. Por lo tanto, se analizaron un total de 35 muestras (20 controles y 15 pacientes positivos a IgM anti-PVB19) y a cada una se les determinaron inmunoglobulinas séricas totales (IgM, IgG e IgA) y componentes del complemento (C3 y C4).

El grupo control estuvo conformado por tres mujeres y 17 hombres en edades comprendidas entre 20 y 47 años de edad. Mientras que el grupo de pacientes con infección aguda por PVB19 estuvo conformado por 10 mujeres y cinco hombres en edades comprendidas entre 21 y 73 años. Se obtuvo información acerca de las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes con infección aguda por PVB19 y se encontró que los padecimientos más frecuentes eran artralgias, fiebre, cefalea, anemia, edema de miembros, astenia, alteración de las subpoblaciones linfocitarias, aborto e infertilidad y en menor frecuencia trombocitopenia, elevación de transaminasas, leucopenia, prurito, eritema y mialgias. Estos datos se visualizan en la Tabla 1. Es importante resaltar que los dos donantes de sangre que se agregaron al grupo de pacientes, se encontraban asintomáticos.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas más frecuentes de los pacientes con infección activa por PVB19.

Manifestación Clínica	Número de casos
Artralgias	5
Fiebre	3
Cefalea	3
Anemia	3
Subpoblaciones linfocitarias alteradas	2
Edema de miembros	2
Astenia	2
Infertilidad y aborto	2

A los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones se les aplicó una estadística descriptiva y test de correlación lineal de Pearson. Los valores de media (\bar{X}) obtenidos para las inmunoglobulinas séricas totales de los controles fueron los siguientes: 99,11 mg/dL para IgM, 225,05 mg/dL para IgA y 1219,69 mg/dL para IgG. Mientras que para los pacientes fueron de 204,83 mg/dL para IgM, 242,47 mg/dL para IgA y 1450,33 mg/dL para IgG. Se compararon las medias (\bar{X}) de los valores obtenidos de inmunoglobulinas séricas totales, y se reflejó que los niveles de estas se encuentran aumentados en los pacientes a comparación del grupo control.

Como se evidencia en la figura 3, existe una clara tendencia en el grupo paciente, de mayor concentración de inmunoglobulinas séricas con respecto al grupo control. Ello se hace más evidente en las concentraciones de IgG e IgM. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Pearson $p > 0,05$), pero podrían indicar un estado de activación inmunológica producto de la infección viral.

En la determinación de inmunoglobulinas séricas totales solo dos individuos del grupo control presentaron valores de IgA e IgG superiores a los valores de referencia. En cuanto a los pacientes con infección aguda por

PBV19, nueve de ellos presentaron valores superiores al valor de referencia: seis para IgM, uno para IgA y dos para IgG.

En la Figura 4, se muestra la presencia de dos datos atípicos en la determinación de IgM e IgA de los controles y la distribución de los datos por encima y por debajo del valor de la media para inmunoglobulinas séricas totales tanto de los controles como de los pacientes con infección aguda.

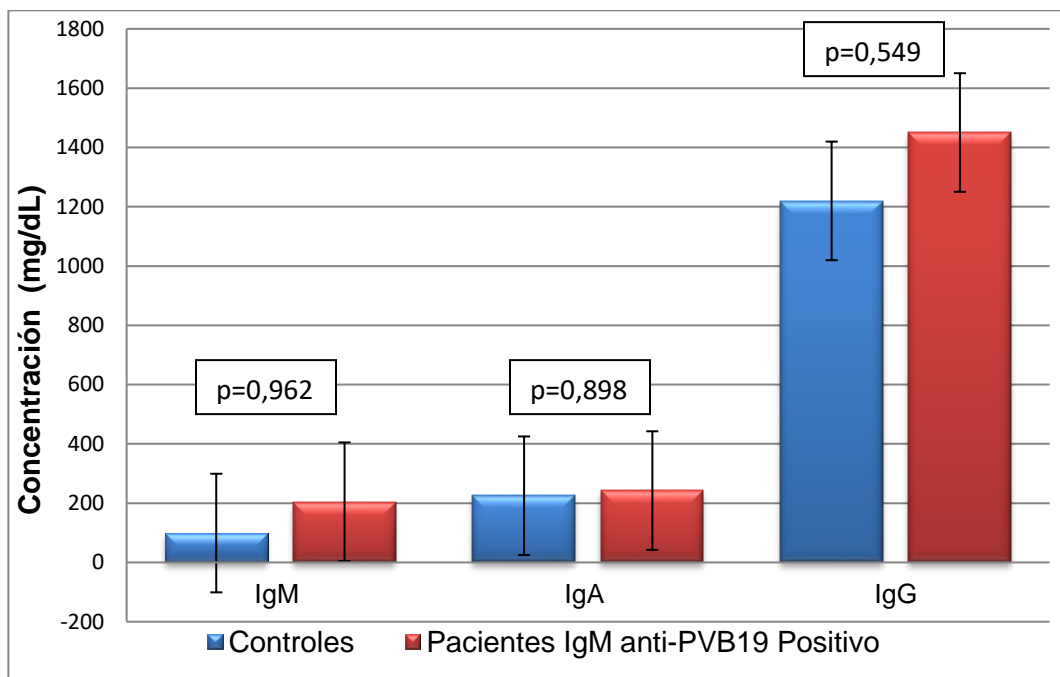


Figura 3. Niveles de inmunoglobulinas séricas totales (mg/dL) en controles sanos y pacientes con infección activa por PVB19.

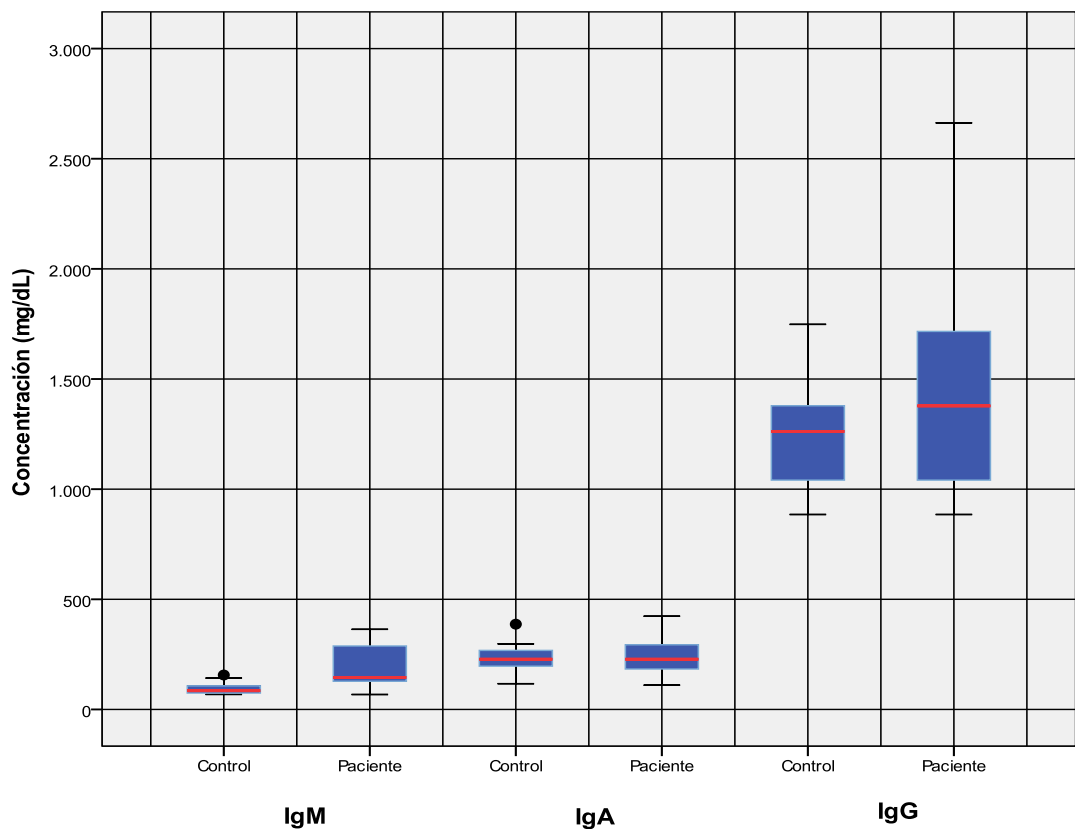


Figura 4. Distribución de los niveles de inmunoglobulinas séricas totales de controles y pacientes con infección aguda por PVB19.

La media (\bar{X}) obtenida de los resultados de C3 para los controles fue de 128,41 mg/dL y para C4 32,78 mg/dL. Mientras que para los pacientes positivos la media de los valores de C3 fue de 155,08 mg/dL y de C4 35,40 mg/dL. De manera similar a los resultados obtenidos en la determinación de inmunoglobulinas séricas totales, el grupo paciente presentó concentraciones de C3 y C4 superior al grupo control, haciéndose más evidente esta tendencia en las concentraciones de C3, esto no tuvo significancia estadística (Pearson $p > 0,05$), sin embargo, refleja una hiperproducción de estas importantes proteínas de la inmunidad innata (Figura 5).

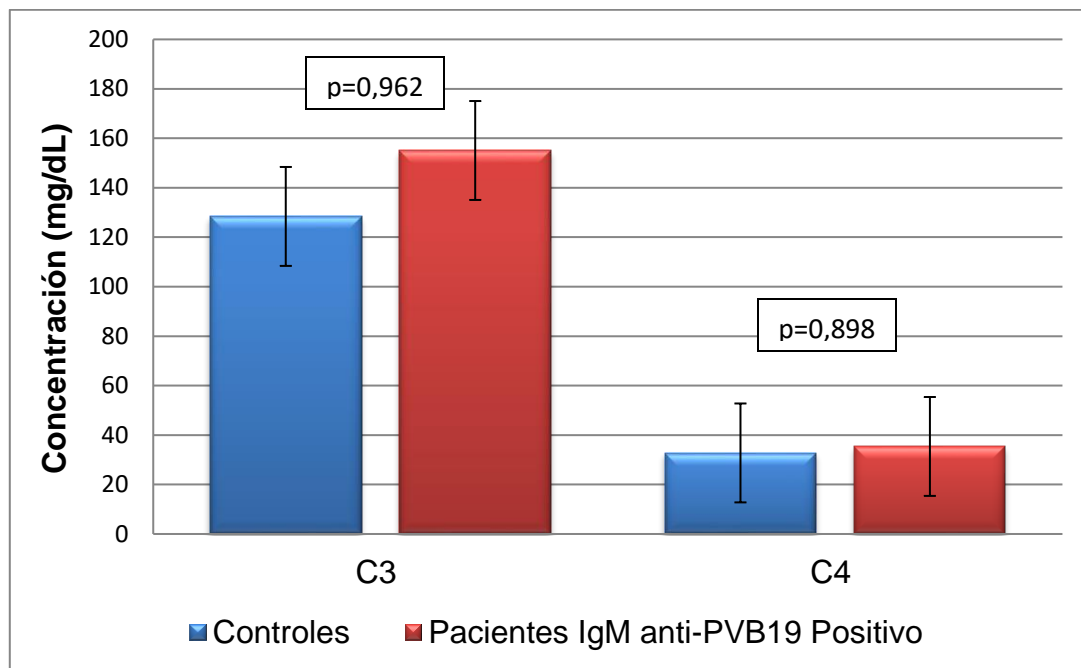


Figura 5. Niveles de C3 y C4 (mg/dL) en pacientes controles y pacientes con infección activa por PVB19.

Tres individuos del grupo de pacientes positivos a PVB19 presentaron niveles de C3 superiores al valor de referencia. Mientras que en la determinación de C4, cuatro individuos del grupo control, y cinco individuos del grupo paciente presentaron valores superiores al valor de referencia.

En la Figura 6, se pueden apreciar dos valores atípicos en la determinación de C3 en los pacientes con infección aguda por PVB19 y la distribución de los datos por encima y por debajo de la media tanto para C3 como C4 de controles sanos y pacientes con infección aguda.

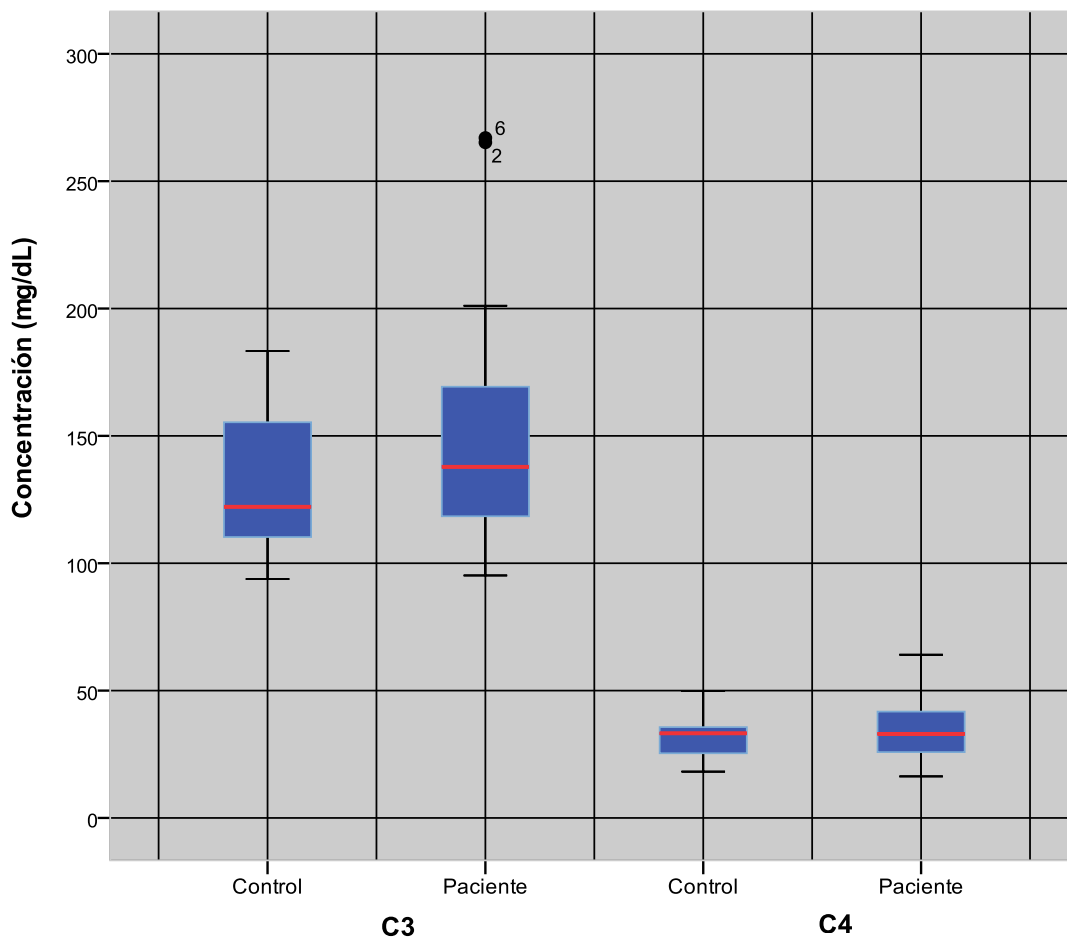


Figura 6. Distribución de los niveles de componentes del complemento de controles y pacientes con infección aguda por PVB19.

DISCUSIÓN

El Parvovirus B19 es un virus cosmopolita que puede afectar al hombre de manera frecuente, sin embargo, en ocasiones las manifestaciones clínicas son leves e inespecíficas, por lo tanto, no se hace el diagnóstico oportuno. En la etapa aguda de la enfermedad el análisis ideal para el diagnóstico es la determinación de anticuerpos IgM anti-PVB19. La infección por PVB19 es común en la infancia, el 50% de los adolescentes a los 15 años tienen anticuerpos IgG anti-PVB19, esta prevalencia aumenta en el tiempo hasta alcanzar el 90% en la tercera edad. No se recomienda practicar PCR en sangre periférica para detección de ADN viral ya que la etapa de viremia solo dura 7 días, tiempo durante el cual la mayoría de los pacientes presenta cuadro clínico leve (fiebre, malestar, cefalea). Aproximadamente 17 a 18 días post infección aparece una segunda fase de síntomas caracterizada por rash, prurito y artralgias. En esta etapa el virus solo puede ser detectado en médula ósea, cuando aparecen las complicaciones asociadas a infección por PVB19, es detectable la IgM específica en sangre periférica (Heegaard y cols., 2002). Ver Figura 2.

En el presente estudio, se analizaron muestras de 23 pacientes que presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de infección aguda por PVB19 de ellos solo 13 resultaron positivos. También se les realizó determinación de anticuerpos IgM anti-PVB19 a un grupo de 22 donantes de sangre (individuos asintomáticos) de los cuales 2 resultaron positivos y pasaron a formar parte del grupo paciente. Los 20 individuos negativos representaron el grupo control. En Venezuela son escasos los estudios de prevalencia en la población en general. González y cols. (1998) en un estudio llevado a cabo en el Banco de Sangre del Estado Zulia, reporta

83,3% de IgG anti-PVB19 en pacientes con crisis aplásica, 68,9% en pacientes sin crisis aplásica y 46,6% en pacientes controles, lo cual indica exposición previa al virus. Solo se observó 8,3% de IgM específica indicativa de infección aguda, en pacientes con crisis aplásica. En el Estado Aragua, la Licenciada Ana María Urquiola Fadull ha sido pionera en el estudio de PVB19, encontrando en el 2007 como parte de su estudio de tesis de maestría, 25% de positividad para IgM anti-PVB19 en una muestra de pacientes con enfermedades autoinmunes, y un acumulado de 550 casos positivos desde el 2006 al 2010, eso solo entre los pacientes que acuden al Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiola Fadull, C.A.

Llama poderosamente la atención el hallazgo de dos donantes de sangre con evidencia serológica de infección aguda, lo cual plantea la imperiosa necesidad de realizar estudios serios de prevalencia y detección de individuos con infección activa a nivel regional y nacional en la población de donantes de sangre. Manaresi y cols. (2004) evaluaron la prevalencia de IgG contra proteínas de la cápside viral de PVB19 (VP1-VP2) en donantes de sangre de Italia, encontrándose 78% de prevalencia para ambas proteínas y 70,9% para la VP1. Por otro lado, Gaggero y cols. (2007) llevaron a cabo un estudio de seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-PVB19 en donantes de sangre de hospitales de Santiago de Chile, reportándose 54,8% de prevalencia. Ambos estudios demuestran que hay un alto índice de donantes de sangre que han estado expuestos al virus. En América Latina hay escasos trabajos de prevalencia en donantes de sangre. Lévicán y cols. (2011) analizaron 475 muestras de donantes de sangre en Santiago de Chile utilizando técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa, encontrando cuatro casos positivos para ADN de PVB19 lo que da una frecuencia de 1/119.

El hecho de encontrar individuos infectados asintomáticos no es inusual, ya que la literatura reporta alta frecuencia de casos asintomáticos (Aristi, 2002). En una Carta al Editor de la Revista Clínica Española, suscrita por Prieto de Paula y cols. (2012), expresan que la afectación en adultos inmunocompetentes es de difícil diagnóstico, la edad media de presentación es de 47 años (la edad media de los controles de este estudio fue de 27,4 años) con predominio de mujeres (75%). Acotan que los síntomas en los adultos sanos son inespecíficos e incluso ausente en la cuarta parte de los casos. Además, Gaggero y cols. (2007) hacen referencia a la transmisión del PVB19 a través de transfusiones de sangre y hemoderivados.

En relación a las manifestaciones clínicas, del grupo en estudio se encontró que el síntoma con mayor frecuencia de casos (cinco) fue la artralgia. Cabe destacar que la forma de presentación depende, en gran medida del estado inmunológico y hematológico del paciente. En individuos sanos la infección generalmente es asintomática o causa enfermedad autolimitada con recuperación espontánea. La inmunidad humoral termina la infección, pues la viremia desaparece una vez que se producen los anticuerpos específicos contra las proteínas estructurales VP1 y VP2 del PVB19. Estos anticuerpos pueden detectarse en suero y constituyen una de las pruebas diagnósticas más utilizadas. La desaparición de los anticuerpos IgM coincide casi siempre con la resolución de las manifestaciones clínicas. En niños o adultos con infección aguda, puede presentarse artropatía autolimitada, simétrica, periférica, con afección frecuente de articulación de muñeca, manos y rodillas. Se han descrito también otras manifestaciones reumatológicas que incluyen varios síndromes vasculíticos y cuadros semejantes al lupus eritematoso sistémico y a la dermatomiositis (Aristi, 2002). El PVB19 puede producir artropatías en adultos por diversos mecanismos, entre ellos la deposición de inmunocomplejos y persistencia en membrana sinovial. Uno de los primeros reportes de persistencia en

membrana sinovial fue publicado por Soderlund y Von Esser (1997), donde se determinó la persistencia de ADN de PVB19 en membrana sinovial, 18 de 20 pacientes en el estudio presentaron ADN de PVB19 en membrana sinovial y anticuerpos IgG anti-PVB19 en circulación.

Artralgias y artritis son las manifestaciones más frecuentes en la infección primaria por PVB19 en adultos, afectando a un 70% de mujeres y 30% de hombres. La artropatía probablemente esta mediada por mecanismos inmunológicos, ya que los síntomas coinciden con la aparición de anticuerpos circulantes. Aparecen como una poliartritis periférica aguda moderadamente severa, la cual involucra las articulaciones carpometafalangeanas (75 %), rodilla (65 %), muñena (55%) y tobillos (40%), sin evidencia de erosión articular. Cerca del 50% de pacientes con artropatía crónica por PVB19 alcanzan los criterios de la American Rheumatoid Assotiation para el diagnóstico de artritis reumatoide. Se ha postulado que el PVB19 está involucrado en la iniciación y perpetuación de artritis reumatoide. Se ha observado que la incubación con PVB19 induce un fenotipo invasivo en los fibroblastos, y la preincubación con sueros viremicos conteniendo anticuerpos neutralizantes de PVB19 elimina este efecto (Heegaard y cols, 2002). En una revisión publicada por Von Landenberg y cols. (2007), se establece que los inmunocomplejos depositados en el fluido sinovial de las articulaciones afectadas, están asociados con la patogénesis de las artralgias en los pacientes con PVB19. El mismo autor menciona las enfermedades autoinmunes que han sido reportadas en asociación con infección por PVB19. Entre las enfermedades autoinmunes donde el órgano involucrado son las articulaciones se encuentran: las artralgias, artritis, monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis idiopática juvenil y artritis reumatoide. En otra publicación, Fernandez-Llanio (2007) indica que aproximadamente el 50% de los adultos con primo infección por PVB19 (frente a un 8% menores de 20 años) presenta artritis.

Otra manifestación clínica importante presentada por los pacientes en este estudio, fue la presencia de anemia. Esta, junto al rash cutáneo, ha sido la manifestación más evidente en los pacientes con infección aguda desde que se iniciaron los estudios científicos de PVB19 encontrándose un total de tres casos en este estudio. Como se ha mencionado anteriormente el PVB19 muestra tropismo hacia los eritroblastos, penetrando al interior de estos a través del receptor celular, el antígeno P. Fernandez-Llanio (2007), refiere que la anemia durante la infección por PVB19 está relacionada a la presencia del antígeno P que actúa como receptor celular. Las personas que no lo expresan son resistentes a la infección por PVB19.

El antígeno P está presente no solo en eritroblastos, sino también en células sinoviales (Soderlund y Von Esser, 1997), megacariocitos, células endoteliales, miocitos, hígado fetal; sin embargo, estas células no son permisivas, el virus para poder replicarse necesita la transcriptasa de los eritroblastos. Al replicarse el virus origina cambios citopáticos con la consiguiente destrucción celular. Durante la viremia los reticulocitos caen a niveles indetectables, recuperándose en siete a 10 días más tarde, ello resulta en un descenso temporal de hemoglobina en las personas sanas. Los fetos nacidos de madres infectadas sufren de anemia congénita (Heegaard y cols., 2002). En pacientes con una destrucción incrementada de las células rojas y una alta demanda de la producción de eritrocitos, la infección aguda por PVB19 puede causar un cese abrupto de la producción de células rojas expresándose esto en una crisis aplásica de células rojas transitoria (Young y Brown., 2004). La anemia observada en estos pacientes también puede ser debida a mecanismos autoinmunitarios. Se ha encontrado homología estructural entre un péptido de la proteína estructural VP1 y el gen GATA, el cual está involucrado en la megacariopoyesis y la eritropoyesis (Lunardi y cols., 2008).

Las alteraciones en las subpoblaciones linfocitarias, fue otro signo evidente en este estudio. Un paciente presentó niveles disminuidos de linfocitos CD4+ y alto conteo de células NK, con un índice CD4+/CD8+ de 1,0; un paciente presentó disminución de los linfocitos CD8+ con un índice CD4+/CD8+ de 3,84. En un estudio realizado en el Banco de Sangre del Estado Zulia, se encontró una disminución de las cifras de LT CD8+, CD4+, células B y células NK en un paciente con IgM anti-PVB19 positiva. (González y cols., 1998). Clínicamente la infección puede evolucionar con linfopenia, neutropenia y trombocitopenia, esta puede ser debida a mecanismos autoinmunitarios o a mecanismos citopáticos indirectos, ya que la proteína viral (NS1) puede ser toxica en las poblaciones celulares que no son permisivas para la replicación del ADN viral. En ese mismo orden de ideas, Heegard y cols., (2002) citan que la trombocitopenia producida por PVB19 puede ser central y periférica. Los mecanismos periféricos se deben a la aparición de anticuerpos antiplaquetarios, y el mecanismo central es debido a supresión de médula ósea, y el posible efecto citopatológico es paralelo al hallazgo de que la proteína NS1 de PVB19 inhibe la formación de colonias de megacariocitos. Esto nos permite hipotetizar que un fenómeno similar es responsable de las alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias con el consiguiente efecto compensatorio de la médula ósea en aumentar una subpoblación linfocitaria en respuesta a la disminución de una de ellas.

Otra manifestación clínica importante de los pacientes en estudio fue abortos e infertilidad, encontrando en dos de los 15 pacientes con infección aguda por PVB19. En Argentina, Pedranti y cols. (2007), analizaron 100 sueros provenientes de mujeres embarazadas asintomáticas, encontrando 66 casos positivos para IgG específica contra PVB19, y 34 negativos, lo cual indica una prevalencia del 66% y una susceptibilidad del 34%. Ello indica que hay una importante proporción de la población de embarazadas en riesgo de adquirir la infección. Más recientemente, Emiasgen y cols. (2011),

analizaron muestras de 273 mujeres embarazadas entre 15 y 40 años de edad encontrando 111 casos positivos a anticuerpos anti-PVB19 (40,7%). De este total de casos, 75 (27,5%) presentaban anticuerpos IgG (exposición previa) y 36 (13,2%) presentaban anticuerpos IgM (infección aguda). La infección primaria en una mujer embarazada tiene un riesgo de un 25% de la infección fetal y la tasa de muerte fetal es de aproximadamente 9% durante las primeras 20 semanas de gestación. La muerte fetal es debido a la *hidrops fetalis*, que es efecto de la depleción de eritrocitos en el feto, la anemia resultante hace que el corazón fetal aumente el gasto cardiaco para suministrar oxígeno a los tejidos (Coon, 2003). El PVB19 probablemente sea el responsable del 10 al 20% de todos los casos de *hidrops fetalis* no inmune (Young y Brown., 2004).

Existe en la literatura un reporte de caso clínico de síndrome hemofagocítico secundario a una infección por PVB19 en una embarazada. El síndrome hemofagocítico es un desorden caracterizado por una proliferación benigna de los histiocitos y la fagocitosis de las células hematopoyéticas normales. Puede ocurrir por diversos estados de compromiso inmunológico o secundario a una gran variedad de infecciones. El comportamiento clínico puede presentarse desde una rápida recuperación hasta la muerte. En el caso descrito se descubrió una aplasia hematopoyética en una mujer de 27 años con 22 semanas de gestación sin factores de riesgo conocidos, presentando signos y síntomas aparentes de un síndrome purpúrico. La serología viral confirmó IgG e IgM positivos para PVB19 y el aspirado de médula ósea demostró una hemofagocitosis reactiva con histiocitos y blastos afectando línea celular roja y blanca. Sin embargo, el cuidado materno-fetal y el manejo conllevó al nacimiento de un recién nacido sin complicaciones (Guzmán y cols., 2008).

Un importante mecanismo implicado en los abortos e infertilidad está representado por el síndrome anti-fosfolípido, desencadenado por la aparición de anticuerpos anti-fosfolípidos. Varios mecanismos pueden estar involucrados en este fenómeno, en primer lugar el mimetismo molecular, en el cual el patógeno expresa proteínas con similitud en la secuencia de aminoácidos en la estructura de un autoantígeno (Sfriso y cols., 2009). Se ha demostrado que un anticuerpo específico IgG anti-VP1 reacciona específicamente con queratina humana, colágeno tipo II y cardiolipina. La explicación más fehaciente para la producción de anticuerpos anti-fosfolípidos estriba en la actividad tipo fosfolipasa A2 de la proteína VP1 del PVB19. Esta actividad enzimática puede contribuir con los procesos inflamatorios inducidos por la producción de leucotrienos y prostaglandinas, pero también puede llevar a la generación de complejos con proteínas celulares o al clivaje inusual de compuestos de fosfolípidos celulares, los cuales pueden inducir anticuerpos antifosfolípidos en combinación con una predisposición genética (Von Landenberg y cols., 2007). Es así como algunos autores describen que seguidamente a un daño tisular, muerte celular, estrés oxidativo, producción de radicales libres observado en algunas infecciones, los cambios generados en las proteínas como resultado de una expresión alterada, desnaturalización u otra alteración estructural que modifique su conformación ante el sistema inmunológico, puede inducir una respuesta autoinmune (Sfriso y cols., 2009). Esto es lo que se conoce como neoantigenicidad.

Tres pacientes manifestaron estar afectados por edema de miembros. En infección por PVB19 se presenta síndrome tipo vasculitis, los cuales se encuentran en pacientes con purpura de Schoenlein-Henoch, síndrome papular-purpúrico “medias y guantes” y enfermedad de Kawasaki la detección de ARN de PVB19 por metodología RT-PCR demuestra que las células endoteliales y las células mononucleares que las rodean pueden ser

blanco de la infección en varias enfermedades del tejido conectivo. Adicionalmente, el PVB19 ha estado implicado en granulomatosis de Wegener (Lehman, 2003). En el trabajo de tesis de maestría “Infección por Parvovirus B19 y su asociación con enfermedades autoinmunes” de la Licenciada Ana María Urquiola (2007), se encontró significancia estadística entre la infección aguda por PVB19 en pacientes con enfermedad autoinmune y la presencia de anticuerpos anti-PR3, un importante marcador serológico de vasculitis autoinmune.

A ambos grupos: pacientes y controles se les realizó determinación de niveles de inmunoglobulinas séricas totales (IgM, IgA, IgG). El grupo de pacientes presentó para IgG una media de 1450,33 mg/dL frente a una media de 1219,69 mg/dL para el grupo control (Valores de Referencia: 800-1800 mg/dL). Dos pacientes presentaron valores superiores al límite máximo de referencia. En la cuantificación de IgM los pacientes presentaron una media de 204,83 mg/dL frente a 99,11 mg/dL para el grupo control. Seis de 15 pacientes se encontraron con valores superiores del límite máximo de referencia. En la determinación de IgA el grupo paciente presentó una media de 242,47 mg/dL frente a 225,05 mg/dL para el grupo control. Un paciente se ubico por encima del valor máximo de referencia al igual que uno de los controles. Para los tres casos (IgG, IgM e IgA), las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 3 y Figura 4). Es muy probable que la ausencia de significancia estadística sea una consecuencia del pequeño tamaño de la muestra, ya que se presentaron largos períodos de desabastecimiento de reactivos durante el tiempo destinado al desarrollo de la fase experimental de este trabajo.

Cuando ocurre la activación del sistema inmune se inician mecanismos a través de los cuales puede generarse directa o indirectamente un aumento en la producción de inmunoglobulinas séricas totales, si esta activación es

exacerbada puede originar diversas patologías. Uno de los mecanismos propuestos son los superantígenos. Una teoría importante del desarrollo de la enfermedad autoinmune en la infección por PVB19 implica la presencia de los superantígenos, que incluyen diversas partículas de proteínas que son capaces de reaccionar con los receptores celulares múltiples. A través de un proceso de mimetismo molecular, los superantígenos virales pueden provocar una respuesta autoinmune en la que el sistema inmune se une a antígenos del organismo en lugar de un agente infeccioso (Moore, 2007). Los superantígenos son proteínas producidas por una variedad de microorganismos, especialmente bacterias, micoplasmas, o células infectadas por virus las cuales se unen al TCR, independientemente de su especificidad antigénica, resultando en la activación de un gran número de linfocitos T de especificidad antigénica diferente, comportándose así como una potente molécula estimulante del sistema inmune (Sfriso y cols., 2009).

En ocasiones también puede producirse la activación policlonal de los linfocitos B en presencia de algunos virus. En estos casos los linfocitos B sintetizan una cantidad anormalmente elevada de inmunoglobulinas con múltiples especificidades en comparación de las personas sanas (Roitt y cols., 2008). Esto podría ser un elemento que explique la tendencia a tener mayores concentraciones de inmunoglobulinas séricas, los pacientes infectados frente a la población sana.

El mimetismo molecular también se describe, como ya ha sido mencionado en párrafos anteriores y podría ser una causa de enfermedad autoinmune en pacientes infectados por PVB19 con la consiguiente hiperproducción de inmunoglobulinas.

Otro de los efectos producidos como consecuencia de la activación del sistema inmunológico en respuesta a la infección por PVB19, y que podría

estar involucrado en una mayor producción de inmunoglobulinas séricas, es el desbalance de citoquinas. Young y Brown (2004) sugieren que la IL-1, el factor de necrosis tumoral (FNT) e interferon gamma (IFN- γ), tienen asociación con la infección sintomática por PVB19 en pacientes con complicaciones neurológicas. Además, PVB19 produce una proteína no estructural (NS1) que funciona como un trans activador transcripcional para el promotor de IL-6, incrementando la expresión en la célula huésped de IL-6. Por lo tanto, la infección por PVB19 puede desempeñar un papel crucial en el desencadenamiento de enfermedades inflamatorias (Tsay y Zouali, 2006). La IL-6 tiene diversas acciones biológicas: estimula la síntesis hepática de reactantes de fase aguda, estimula la producción de neutrófilos, y estimula el crecimiento de linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos (Abbas, 2008), por lo tanto favorece la hipergammaglobulinemia. Al promover la apoptosis y trans-activación de los promotores de citoquinas pro-inflamatorias, PVB19 puede romper el equilibrio delicado entre la supervivencia celular y la apoptosis, y puede contribuir a la desregulación inmune (Tsay y Zouali, 2006).

Es evidente, entonces, que una consecuencia de la infección por PVB19, es una respuesta inflamatoria sistémica, debido a la amplia distribución del receptor celular, pero como solo los eritroblastos son permisivos a la replicación, la acumulación de proteínas virales tienen un efecto citotóxico en otros tipos celulares. Las células endoteliales del miocardio se han identificado como células blanco específicas para el PBV19, se ha reportado procesos inflamatorios en células endoteliales humanas con disregulación de traducción de señales inflamatorias y activación de citoquinas, activación de canales de calcio como consecuencia de la actividad fosfolipasa A2 de VP1, y clivaje específico de la isoforma 1 de la bomba de intercambio sodio-

hidrógeno, todo ello está implicado en la miocarditis asociada a PVB19. (Bock y cols., 2010).

En el transcurso de esta investigación, nos fue donado un equipo para la determinación de IL-6, y se planteó incluir la cuantificación de esta citoquina como un objetivo más del trabajo, sin embargo, los resultados no pudieron ser incluidos por razones técnicas. Los sueros de los pacientes se habían sometido a múltiples procesos de congelación-descongelación, lo cual ocasionó, probablemente por daño de la muestra, que las concentraciones de los pacientes fuesen indetectables.

Al cuantificar los componentes C3 y C4 del complemento sérico a pacientes y controles, se evidenció una cinética similar a la de los resultados de inmunoglobulinas séricas totales anteriormente expuestos, es decir, una tendencia en los pacientes con infección aguda de mostrar concentraciones de ambas proteínas superiores al control (Figura 5), sin que estas diferencias resultasen estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Como se mencionó con anterioridad, el pequeño tamaño de la muestra sin duda influyó en este último aspecto.

El C3 es la proteína central del sistema del complemento la cual se escinde y su fragmento de mayor tamaño C3b, queda depositado sobre la superficie microbiana, donde se activa el complemento. El C3b forma un enlace covalente con los microbios y funciona como una opsonina para favorecer su fagocitosis. También se libera un fragmento más pequeño C3a, que estimula la inflamación al actuar como factor quimiotáctico de los neutrófilos (Abbas, 2008). Previamente se ha discutido la disregulación de citoquinas pro-inflamatorias en el transcurso de la infección aguda por PVB19, algunas de las cuales se conocen como “citoquinas de alarma” (TNF, IL-6), caracterizadas por aumentar la síntesis hepática de reactantes

de fase aguda. Los niveles del complemento pueden encontrarse elevados en procesos agudos. González y cols. (2010), indicaron que los valores de C3 y C4 se muestran elevados durante la inflamación, y actúan como reactantes de fase aguda positivos. La literatura reporta la deposición de inmunocomplejos como mecanismo de daño tisular en la patogenia de la infección por PVB19 (Young y Brown., 2004; Von Landerberg y cols., 2007). Por otra parte, en el trabajo de Maestría “infección por Parvovirus Humano B19 y su asociación con enfermedades autoinmunes” realizado por la Licenciada Ana María Urquiola Fadull en 2007, se encontró niveles disminuidos de C3 en pacientes con enfermedad autoinmune e infección por PVB19, los cuales fueron estadísticamente significativos al compararlos con pacientes con enfermedad autoinmune pero sin la infección. Por lo tanto, el hallazgo de nuestro estudio fue de alguna forma inesperado. Ello puede ser debido a que la población estudiada fue diferente, y probablemente se encontraba en un estadio mas temprano de la infección, y el consumo de complemento no superaba aún la tasa de producción.

CONCLUSIONES

- Durante la recolección de las muestras, se encontró dos donantes de sangre con infección aguda por PVB19, los cuales estaban completamente asintomáticos.
- Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los pacientes estudiados fueron: artralgias, anemia, infertilidad y aborto, alteraciones cuantitativas en las subpoblaciones linfocitarias, específicamente CD4+ y CD8+.
- El grupo de pacientes en estudio presentó una tendencia a mayor concentración de inmunoglobulinas séricas totales (IgM, IgA e IgG) con respecto al grupo control, haciéndose más evidente en la concentración de IgM. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.
- El grupo de pacientes en estudio presentó una tendencia a mayor concentración de proteínas C3 y C4 del complemento con respecto al grupo control, haciéndose más evidente en la concentración de C3. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda masificar los estudios sobre las manifestaciones clínicas y las complicaciones en la infección por PVB19, para ofrecer mayor información a los clínicos, de manera tal que se favorezca el diagnóstico oportuno y se optimice el manejo del paciente.
- Se sugiere realizar investigaciones similares con una muestra de mayor tamaño, lo cual permitiría dilucidar si las tendencias observadas en este estudio pudiesen sustentarse como estadísticamente significativas.
- Se propone la realización de estudios de prevalencia en donantes de sangre en nuestro país, como forma de sustentar la propuesta de incluir la determinación de anticuerpos IgM específicos anti-PVB19 en el tamizaje de donantes de sangre en los Bancos de Sangre de Venezuela.
- Se recomienda a la Universidad, canalizar a través de Instituciones Privadas y Públicas, un programa de fondos para trabajos de Pre-Grado, ya que los insumos y materiales utilizados son importados y por lo tanto de muy alto costo. Dicho programa se sugiere no sólo sea de apoyo económico, sino logístico, en virtud de el considerable retraso que presentan las casas distribuidoras para ingresar al país estos insumos, debido a los crecientes trámites burocráticos en la aduana, y en la adquisición de divisas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A., y Pober, J. (2008). *Inmunología celular y Molecular*. (4ta Ed). Madrid: Interamericana-McGraw Hill.
- Aristi, G. (2002). Parvovirus B19. *Revista médica del hospital general de México*, 65(1), 30-35.
- Bock, C.T, Klingel, K., y Kandolf, R. (2010). Human Parvovirus B19 Associated Myocarditis. [Carta al Editor]. *The New England Journal of Medicine*.
- Brown, K. (2002). Parvovirus B19. En, G. Mandell, J. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica* (pp.2055-2062). Madrid: Elsevier.
- Coon, D. (2003). Parvovirus B19: Characteristics, diseases, and diagnosis. *Clinical microbiology newsletter*, 25 (21), 161-167.
- Emiasegen, S., Nimzing, L., Adoga, M., Ohagenyi, A., y Lekan, R., (2011). Parvovirus B19 antibodies and correlates of infection in pregnant women attending an antenatal clinic in central Nigeria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(2), 227-231.
- Espinoza, R. (2009) *Clínicas Reumatológicas de Norteamérica*. (35). Barcelona: Elsevier.
- Fernandez-Llanio, N. (2007). La infección por Parvovirus B19 y sus complejas manifestaciones. *Revista Reumatismos publicación Oficial de la Sociedad Española de Reumatología* [Revista en línea], 5 (22) 15-20. Disponible:http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/publicaciones/Revista_Reumatismos/LRn22.pdf [consulta: septiembre 10, 2011].
- Fonseca, E., Nuño, F., Noval, J., y Menéndez, M. (2004). Fiebre y artritis en una mujer de 36 años. *Revista Clínica Española*, 204(4), 229-30.
- Gaggero, A., Rivera, J., Calquin, E., Larrañaga, E., León, O., Diaz, P., y Gaggero, N. (2007). Seroprevalencia de anticuerpos IgG contra Parvovirus B19 en donantes de sangre de hospitales en Santiago de Chile. *Revista médica de Chile*, 135,443-448.

- González, M., Hassanhi, M., Rivera, S. León, M. Plumacher, Z. De Salvo, L. Salas, D. y Novoa, E. (1998). Detección de Parvovirus B19 en pacientes del banco de sangre del estado Zulia con diversas alteraciones hematológicas. *Sangre*, 43(5), 371-375.
- Galán, M. y Moreno J.C. (2004). Exantemas virales de la infancia. *Pediatría integral*, 8(4), 289-314.
- Guzmán, E. Rico. Vidal, V.M. y Figueroa, D. (2008). Síndrome hemofagocítico secundario a infección por Erytrovirus B19 y embarazo. *Revista chilena de obstétrica y ginecología*, 73(6) ,406-410.
- Heegaard, E., y Brown, K. (2002). Human Parvovirus B19. *Clinical microbiology Reviews*, 15(3), 485-505.
- Isa, A., Lundqvist, A., Lindblom, A., Tolfvenstam, T., y Broliden, K. (2006). Cytokine responses in acute and persistent human parvovirus B19 Infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 147, 419-425.
- Kishore, J., Srivastava, M., y Choudhury, N. (2011). El estudio serológico de la Infección por parvovirus B19 en pacientes con talasemias mayor multitransfused y su transmisión a través de unidades de donantes. *Asian Journal of transfusion science*, 5(2), 140-143.
- Lévican, J., Torres, M., Gaggero, N., Corvalán, R., y Gaggero, A. (2001). Detección de ADN de parvovirus B19 en donantes de sangre de tres Hospitales en Santiago, Chile. *Revista médica de Chile*, (139) ,143-149.
- Lunardi, C., Tinazzi, E., Bason, C., Dolcino, M., Corrocher, R., y Puccetti, A. (2008). Human Parvovirus B19 infection and autoimmunity. [Resumen en línea]. *Autoimmunity Reviews*. 8(2), 116-120. (Tomado de la Página Web de ScienceDirect) Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997208001171> [Consulta: Julio, 20, 2012].
- Manaresi, E., Gallinella, G., Morselli, Labate AM., Zucchelli, P., Zaccarelli, D., y Ambretti, S. (2004). Seroprevalence of IgG against conformational and linear capsid antigens of Parvovirus B19 in Italian blood donors. *Epidemiology and Infection* 132 (05), 857-862
- Moore, E. (2007). Human Parvovirus B19 Infection. *Autoimmune Disease Trigger*. Abril, 1, 2007.

- Murray, P., Rosenthal, K., Kabayashi, G., y Pfaller, M., (2003). *Microbiología Médica*. (4ta Ed). España: Elsevier.
- Pedranti, S., Adamo, P., Macedo, R., y Zapata, T., (2007). Prevalencia de anticuerpos anti-rubeola y anti-parvovirus B19 en embarazadas de la ciudad de Córdoba y en mujeres en edad fértil de la ciudad de Villa Mercedes, San Luis. *Revista argentina de microbiología*, 39, 47-50.
- Prieto de Paula, J.M, Franco, S., Eiros, J.M, Rojo, S. (2012). Infección por Parvovirus B19 en adultos sanos. [Carta al Editor]. *Revista clínica española*.
- Roitt, I., Delves, P., Martin, S., y Burton, D. (2008). *Roitt inmunología fundamentos*. (11a ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- Ruiz de Alegría, C., Balbás, R., Herrera, M., Martínez, M. (2009). Seroprevalencia del parvovirus B19 humano en la población ambulatoria de Cantabria, norte de España. *Servicio de microbiología Hospital universitario marqués de Valdecilla, Santander, España*, 15(3), 485-505.
- Servant-Delmas, A., Lefrere, J., Morinet, F., Pillet, S. (2010). Advances in Human B19 Erytrovirus Biology. *American society for microbiology*, 84(19), 9658-9665.
- Sfriso, P., Ghirardello A., Botsios, C., Tonon, M., Zen, M., Bassi, N., Bassetto, F., y Doria, A., (2009). Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *The Journal of Leukocyte Biology*, (87).
- Soderlund, M., y Von Essen, R. (1997). Persistence of Parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Biomedical Reference Collection*, 349 (9058), 1063-1065.
- Tapia, A.M., Dominguez, M., Del Alamo Gutiérrez, C. (2005). Infección por Erytrovirus B19. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica*, 24(1), 24-29.
- Tsay, G. y Zovalí, M. (2006). Unscrambling the role of human Parvovirus B19 signaling in systemic autoimmunity. *Revista Elsevier*, 7(11), 1453-9.
- Vélez, H., Rojas, W. Borrero., Restrepo, J., Restrepo, A., y Robledo, J. (2004). *Enfermedades infecciosas*. 6ta Edición.
- Von Landenberg, P., Lehmann, H., y Modrow, S. (2007). Human parvovirus B19 infection and antiphospholipid antibodies. *Elsevier*, (6), 278-285.

Waldman, M., y Koop, J. (2007). Parvovirus B19 and the kidney. *Clinical journal of the American society of Nephrology*, (2), S47-S56.

Weissbrich B, Süß-Fröhlich Y, y Girschick HJ. (2007). Seroprevalence of parvovirus B19 IgG in children affected by juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 9(4), R82.

Young, N., y Brown K. (2004). Mechanisms of disease Parvovirus B19. *The New England Journal of Medicine*, (350), 586-597.

ANEXOS
ANEXO A
FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO DEL ADULTO



Universidad de Carabobo
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Bioanálisis
Sede Aragua.



Laboratorio inmunológico Ana María Urquiola Fadull, C.A
Inmunoaragua, C.A

Consentimiento para Participar en un Estudio de Investigación.
(Personas mayores de 18 años)

**Título del Proyecto: EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN
PACIENTES CON INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19.**

Nº De ID del participante _____

- 1. PROPÓSITO:** la Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua, en conjunto con el Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiola Fadull, C.A, están realizando un estudio con la finalidad de evaluar la inmunidad humoral en los pacientes infectados por Parvovirus B19, que acuden a la consulta de Inmunoaragua, C.A. Nos gustaría solicitarle que participe voluntariamente en este proyecto de investigación que incluirá un aproximado de 60 personas. Su participación en el estudio será de 1 día para la toma de la muestra sanguínea.

- 2. PROCEDIMIENTOS:** la finalidad de este estudio es detectar pacientes infectados por Parvovirus B19 en la fase aguda (infección reciente) y evaluar la respuesta inmunológica. Si usted decide participar en el estudio, le solicitamos que nos provea una muestra de sangre de 10ml, en las cuales vamos a determinar, si usted está infectado por Parvovirus B19 y sus niveles de inmunoglobulinas (anticuerpos IgG, IgA e IgM) estas últimas nos permitirán evaluar su respuesta inmunológica ante la infección.
- 3. RIESGO PARA EL PARTICIPANTE:** la sangre le será extraída del antebrazo con una aguja por personal con experiencia. El riesgo de que pueda salir lastimado durante la colecta de sangre es mínimo, pero es posible que sienta algún dolor o incomodidad cuando le extraigan la sangre de su antebrazo; después puede presentarse algún moretón o hinchazón. Con muy poca probabilidad, podría presentarse una infección en el sitio donde se extrajo la sangre. Puede presentarse mareos o desmayos cuando se les este tomando la muestra, pero esto es poco común y la sensación pasara rápidamente.
- 4. BENEFICIOS POTENCIALES:** el principal beneficio será la detección de anticuerpos contra el virus, en caso de que haya sido infectado recientemente. Además usted contribuirá a aumentar los conocimientos (en Venezuela) de la relación que existe entre la infección por este virus y los niveles de proteínas de defensa del sistema inmunológico. Su participación en el presente estudio no tendrá una retribución económica, ni durante la toma de muestra ni después.
- 5. COSTOS:** el costo de los análisis que usted requiera luego de la consulta deberán ser asumidos por usted en el momento en que acepte participar en este estudio, por lo que sugerimos informarse del monto total de la prueba. Los exámenes que no requiera, serán asumidos por nosotros.
- 6. CONFIDENCIALIDAD DEL INDIVIDUO:** toda la información relacionada con este proyecto será confidencial. Los documentos de esta investigación serán mantenidos en el Laboratorio Inmunológico Ana María Urquiola Fadull, C.A. ubicado en la Urbanización Calicanto, edificio Rincón de los Toros, piso 4, oficina 46, Maracay, estado Aragua. Mantendremos los documentos en privado hasta donde sea legalmente posible, durante un periodo de 5 años, bajo la tutela de la Licenciada Ana María Urquiola Fadull.
- 7. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:** Usted puede decidir, no formar parte del estudio, o podría dejar de pertenecer a este en cualquier momento sin consecuencias negativas.

8. PUNTOS DE CONTACTO: Si usted quiere conversar con alguien sobre cualquier tema relacionado con este estudio, por favor contactar a Ana Bersovine al 0424-4891729, a Merlys Arvelaez al 0426-2351543, a la Licenciada Ana María Urquiola al 0243-2452168 o a la Dra. Sleygh Castillo al 0416-6466711.

9. CONSENTIMIENTO DEL ADULTO: Su firma en este formulario indica que se le ha explicado el estudio y que ha decidido formar parte del mismo, asumiendo el costo correspondiente a las determinaciones.

Es posible que después de que completemos las pruebas de laboratorio con sus muestras de sangre y saliva, quede un remanente de las mismas ¿Qué desea usted que hagamos con los remanentes de sus muestras? Coloque una X en una sola opción:

_____ Después de completar el estudio, destruyan todas las muestras restantes.

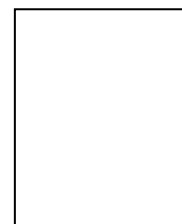
_____ Después de completar el estudio, las muestras restantes pueden ser utilizadas para cualquier propósito científico siempre que mi muestra no esté identificada con mi nombre sino sólo con un número. También entiendo que no habrá compensación por el uso futuro de mis muestras.

Si cambia de opinión, en cualquier momento, y desea que se destruyan las muestras de sangre remanentes contacte a Ana Bersovine al 0424-4891729, a Merlys Arvelaez al 0426-2351543, a la Licenciada Ana María Urquiola al 0243-2452168 o a la Dra. Sleygh Castillo al 0416-6466711.

Nombre del Paciente _____ Edad _____

Firma del Paciente _____ Fecha _____

C.I. _____



Huella dactilar

Responsable de la tutoria de las muestras _____

C.I. _____

RETIRO VOLUNTARIO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO
EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON
INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19

Yo, _____, portador de la C.I Nro
_____, decido voluntariamente retirarme del estudio,
Evaluación de la inmunidad humoral en pacientes con infección aguda por
Parvovirus B19.

Firma

C.I. _____



Huella dactilar

ANEXO B

**EVALUACIÓN DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN PACIENTES CON
INFECCIÓN AGUDA POR PARVOVIRUS B19**

FICHA DE DATOS

Nro. De identificación del paciente _____

Fecha de consulta _____

Signos y Síntomas

Inicio de los signos y síntomas

Otras observaciones

Pruebas de Laboratorio

RESULTADOS

- | | |
|--|-------|
| <input type="checkbox"/> Determinación de IgM anti- Parvovirus B19 | _____ |
| <input type="checkbox"/> Inmonoglobulinas totales (IgG, IgM e IgA) | _____ |
| <input type="checkbox"/> Componentes del complemento (C3 y C4) | _____ |
| <input type="checkbox"/> Prueba de embarazo | _____ |