

Artículo original

Infección por virus Epstein Barr en niños VIH positivos: Relación con carga viral del VIH y conteo de linfocitos T CD4+

María de los Reyes Chacón de Petrola^{a,*}, Olga Castillo de Febres^b, Miriam Sánchez de Naveda, Liliana Castro, Ladys Casanova de Escalona, María Elisa Flores Chávez

^aUnidad de Investigaciones en Inmunología Clínica

^bUnidad de Investigación en Infectología Pediátrica Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de Carabobo
Valencia - Venezuela

Recibido 10 de marzo de 2008; aceptado 13 de julio de 2008

Resumen: El objetivo de este trabajo fue estudiar la infección por Epstein Barr en niños VIH+ menores de 12 años, de ambos sexos, con TARAE y su relación con carga viral del VIH y conteo de linfocitos T CD4+. La detección de IgM/IgG anti CVA y anti EBNA1 se realizó por ELISA, la cuantificación de EBV en sangre periférica por PCR y el inmunofenotipaje por citometría de flujo. Estudio estadístico mediante el análisis de correlación de Spearman y la prueba de t de Student. Se evaluaron 21 niños con edades comprendidas entre 3 a 12 años, 18 de los cuales (85,7%) presentaron carga viral detectable para EBV. Dos de ellos tuvieron infección aguda temprana (IgM CVA e IgM EBNA1 +), 5 infección aguda tardía (IgM CVA - IgM EBNA +) con carga viral para EBV de 573 copias/ml, y 14 con infección pasada (IgG CVA e IgG EBNA positivos), 11 de los cuales tenían carga viral para EBV de 646 copias/ml (crónicos activos). No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar los promedios de las cargas virales de EBV en infecciones agudas y pasadas, ni entre esas cargas y las de VIH, pero si con los conteos de linfocitos T CD4+: cifras menores se correlacionaron con niveles altos de carga viral de EBV ($p < 0,05$). Debe realizarse detección de los anticuerpos anti CVA y EBNA1 así como cuantificación de EBV por pruebas moleculares a todo niño VIH positivo, ya que a menor conteo de linfocitos T CD4+ mayor carga viral de EBV.

Palabras clave: Virus Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana, serología, PCR, carga viral, linfocitos T CD4+

Epstein Barr virus infection in HIV positive children: relationship with viral load and T CD4+ lymphocyte count

Abstract: The purpose of this work was to study Epstein Barr infection in HIV+ children less than 12 years old of both sexes, with TARAE and its relationship with the HIV viral load and T CD4+ lymphocyte count. The detection of anti CVA and anti EBNA1 IgM/IgG was done by ELISA, the EBV quantification in peripheral blood by PCR, and the immunophenotype by flow cytometry. The statistical study was done through Spearman's correlation analysis and Student's t test. The evaluation included 21 children with ages between 3 and 12 years, 18 of which (85.7%) presented a detectable EBV viral load. Two of them had an acute early infection (IgM CVA and IgM EBNA1 +), 5 an acute late infection (IgM CVA - IgM EBNA+) with a EBV viral load equal to 573 copies/ml, and 14 with past infections (IgG CVA and IgG EBNA positive), 11 of which had an EBV viral load equal to 646 copies/ml (active chronics). There were no statistical significant differences when comparing the mean EBV viral load in acute and past infections, nor between those loads and the HIV loads, but there were differences in the T CD4+ loads; lower numbers were correlated with high EBV viral loads ($p < 0.05$). Detection of anti CVA and EBNA1 antibodies, as well as EBV quantification through molecular tests, should be done to all HIV positive children, since a lower T CD4+ lymphocyte count means a higher EBV viral load.

Keywords: Epstein Barr Virus, Human Immunodeficiency Virus, Serology, PCR, viral load, CD4+ lymphocytes

* Correspondencia:
E-mail: mreyes72ch@gmail.com

Introducción

El virus de Epstein Barr es un gammaherpesvirus humano ubicuo, con un fuerte linfotropismo por células B, es-

trechamente asociado con el desarrollo de severas enfermedades malignas, particularmente en hospederos inmunocomprometidos (linfoma de Burkitt, enfermedad de Hodgkin y linfoma de células B), por lo que la infección

activa puede contribuir significativamente a la morbimortalidad de los pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con SIDA [1,2].

Posterior a la infección aguda, el virus persiste en forma latente durante toda la vida en los linfocitos B de memoria en reposo, con reactivaciones periódicas, infectando nuevas células: durante esta fase de replicación se pueden encontrar en sangre periférica células B circulantes infectadas, en un número que varía considerablemente entre los individuos infectados y con potencial para transformación maligna. Afortunadamente, la mayoría de los portadores permanecen libres de neoplasias debido al control efectivo por el sistema inmune, fundamentalmente a través de linfocitos T citotóxicos específicos [1,3-5].

Hoy en día, debido a la poca especificidad de la prueba de anticuerpos heterófilos, el diagnóstico de infección por el EBV se basa en técnicas serológicas. Cuando la infección es primaria aguda, la muestra sérica contiene tanto IgG como IgM contra el antígeno de la cápside viral (ACV). Pueden estar presentes también anticuerpos contra el denominado antígeno precoz del EBV, pero la mayoría no tienen anticuerpos detectables anti EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen) o bien existen títulos apenas detectables. Si la sintomatología se relaciona con una infección persistente o una reactivación viral, el patrón serológico generalmente observado es IgG anti ACV en altos títulos, con IgM anti ACV negativa y anti EBNA positivo. Los anticuerpos IgG anti ACV y anti EBNA persisten de por vida e identifican a portadores crónicos [6,7]. En el hospedero inmunocomprometido, la reactivación del virus se produce más frecuentemente, con el consiguiente aumento de susceptibilidad a procesos patológicos ligados con la infección por el EBV; en este grupo, la respuesta serológica no siempre es útil, dado que puede estar ausente o incompleta, siendo necesaria la demostración del ácido nucleico del EBV en tejidos o sangre, idealmente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (carga viral) [1,6,8].

En portadores sanos, no se ha establecido claramente la relación entre los marcadores serológicos presentes en un momento dado y la carga viral en sangre periférica; en pacientes inmunosuprimidos, específicamente con infección por el VIH, los resultados son todavía más contradictorios y no se ha podido establecer a ciencia cierta la posible relación entre la carga viral para el EBV, el grado de inmunosupresión y la carga viral para el VIH [1].

La presencia de anticuerpos anti EBNA se asocia con infección pasada por el EBV [9,10], sin embargo, específicamente los que se producen en contra del EBNA1 deben ser cuidadosamente interpretados. Este antígeno es expresado periódicamente en las células B de memoria para asegurar el pasaje del episoma viral durante la división celular y es crucial para la persistencia del virus; su presencia es diagnóstica de replicación viral, puede dar lugar inicialmente a la producción de anticuerpos tipo IgM, y secundariamente a los de tipo IgG en repeticiones sucesivas [1,9,11-13].

Con el fin de aclarar la utilidad y significado de las diferentes pruebas señaladas, en la presente investigación se

realizó un despistaje de infección por el EBV en pacientes pediátricos infectados por el VIH, a través de ensayos serológicos: detección de anticuerpos IgM e IgG anticápside viral (anti ACV) y anti EBNA1 y de la cuantificación del ADN-EBV en sangre periférica y su correlación con la carga viral del VIH y el conteo de CD4+.

Materiales y Métodos

1.- Diseño de la investigación

Estudio transversal y descriptivo, en niños con diagnóstico confirmado de infección por VIH, con terapia antirretroviral de alta efectividad (TARAE), que acuden mensualmente a control en la Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo Hospital "Enrique Tejera", Valencia, Venezuela. Se contó con la aprobación del Comité de Ética de la institución hospitalaria. Las muestras fueron recolectadas durante el período 2005-2006.

2.- Sujetos

2. a. Criterios de inclusión

- Edad igual o menor a 12 años.
- Ambos sexos.
- Diagnóstico confirmado de infección por VIH.
- Recibiendo TARAE.
- Cuentas de linfocitos T CD4+ y carga viral para el VIH en el momento de su inclusión.
- Posibilidad certera de obtener muestras de sangre para serología y PCR EBV en los 7 días siguientes a la realización del conteo de linfocitos T CD4+ y la carga viral para el VIH.
- Ausencia clínica de datos sugestivos de infección por el EBV (asintomáticos).
- Consentimiento informado por escrito, por parte de los padres o representantes legales del menor.

2. b.- Criterios de exclusión

- Complicaciones asociadas con la infección por VIH.
- Hospitalización.

3.- Interpretación de los resultados

I.- Infección aguda

- Temprana: Caracterizada por la presencia de IgM anti EBNA 1 e IgM anti ACV.
- Tardía: Cuando la IgM anti EBNA 1 es positiva con ausencia de IgM anti ACV.
- En ambas etapas existe carga viral del EBV en sangre periférica y serológicamente la IgG anti ACV puede estar o no presente con ausencia de IgG anti EBNA1.

II.- Infección pasada

IgM anti ACV y anti EBNA1 negativos, IgG anti ACV y anti EBNA1 positivos: con carga viral presente: infección crónica activa, de estar ausente: infección pasada no activa.

3.- Metodología

En un lapso de tiempo no mayor de 7 días de realizada la cuantificación de linfocitos T CD4+ y la carga viral para el VIH, a cada niño se le extrajeron 10 cc de sangre de la vena del pliegue del codo, en dos tubos, uno de ellos sin anticoagulante para la obtención de suero, y el segundo con heparina para la cuantificación de la carga viral del EBV.

El estudio de IgM e IgG anti ACV y anti EBNA1 se realizó mediante la técnica de ELISA, utilizando el ensayo comercial World Diagnostic, Inc. Lab. Systems.

La obtención del ADN de EBV, siguiendo el protocolo de Wizard Genomic DNA Purification Kit, se procedió a lisar los glóbulos rojos y blancos del paciente mediante la adición, de solución de lisis celular y, posterior al descarte del sobrenadante, una solución de lisis nuclear para liberar el ADN, el cual se obtuvo por precipitación con isopropanol, con descarte del sobrenadante; el resto se colocó en un bloque térmico para ser secado a 55° por 10 minutos y posteriormente fue hidratado con buffer. Para verificar la calidad del ADN de cada muestra, las mismas se corrieron en un gel de agarosa al 1% preparado en solución 0,045 M tris-borato, 0,001M EDTA pH 8,0 (TBE 1X) más 0,5 ug/ml de bromuro de etidio por 45 minutos a 100 V, observándose las bandas de ADN a través de la luz ultravioleta, considerándose de buena calidad cuando estaban bien definidas y uniformes. Para los experimentos de amplificación se utilizaron 100ng de ADN total, amplificado en un termociclador modelo PTC-100 (M.J Research, Inc). La detección del producto amplificado y la cuantificación viral se realizó usando el estuche Quantitative EBV PCR Detection Kit (Biosource International).

4.- Análisis estadístico

Para el procesamiento y análisis de la información se utilizó el paquete estadístico SPSS, versión 11.0 en español. Se usaron técnicas descriptivas (análisis de frecuencia, porcentajes y promedios aritméticos) y de asociación (coeficiente de correlación de Spearman). También se utilizó el análisis de significación de igualdad de distribuciones de la U de Mann Whitney, dado que los valores de las cargas virales del EBV no siguen una distribución normal (Prueba de Kolmogorov). En relación a las otras variables (carga viral del VIH y porcentaje de linfocitos CD4+), éstas se adaptaban al modelo de distribución de curva normal, por lo que se utilizó la prueba de diferencia de medias de grupos independientes de la t de Student.

Resultados

Se evaluaron 21 niños, 7 menores de tres años, ocho entre 4 y 6 y seis entre 4 y 11 años de edad (13,3%, 38,1%

y 28,6% respectivamente). Del total de niños evaluados 19 tuvieron anticuerpos anti EBNA1 positivos.

Siete niños (33,3%) fueron catalogados como portadores de infección aguda: dos (28,6%) con IgM anti ACV e IgM anti EBNA positivos, ubicados por lo tanto dentro la fase temprana del proceso agudo y cinco (71,4%) con IgM anti ACV negativa e IgM anti EBNA positiva, que corresponden a la fase tardía de dicha etapa; todos presentaron cargas virales para el EBV detectables, con un promedio de $573,3 \pm 645$ copias por ml.

Los 14 pacientes restantes presentaron IgM anti ACV negativa, IgG anti ACV positiva e IgG anti EBNA positiva, interpretándose como infección pasada, de los cuales, 11 (78,6%) presentaron carga viral detectable para el EBV ($X = 646 \pm 438,8$ copias por ml) y se consideraron con infección crónica activa.

De los 21 niños estudiados, 18 (85,7%) presentaron cargas virales detectables en sangre periférica para el EBV, sin evidencia clínica de infección por este virus. Al comparar los promedios de carga viral entre los pacientes con infección aguda y pasada no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias entre la presencia o no de EBV detectable y los promedios de carga viral del VIH, pero sí con el promedio de linfocitos T CD4+ en sangre periférica. (Tabla 1). Adicionalmente al realizar el coeficiente de correlación de Spearman se evidenció que la disminución de las cifras porcentuales de los linfocitos T CD4+ se correlacionó con niveles más altos de la carga viral para el EBV, lo que no ocurre con la carga viral para el VIH. (Figuras 1 y 2).

En los niños con infección pasada por el EBV, al analizar estos mismos parámetros (carga viral del VIH y porcentaje de linfocitos CD4+, con la carga viral para el EBV en sangre periférica), nuevamente se evidenció la relación estadísticamente significativa entre los valores en porcentaje de linfocitos T CD4+ y la presencia o no de carga viral para el EBV, lo que no ocurre con la carga viral del VIH.. Por otra parte, los niños con infección aguda temprana, tienen un promedio de carga viral para el EBV de 994 copias por ml, mientras que cuando esa infección ha avanzado en el tiempo a una fase más tardía dentro del mismo periodo (agudo), el promedio de las cargas es inferior, 507 copias por ml, sin embargo, a pesar de observarse esta tendencia, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2).

Discusión

La dinámica de la infección por el EBV y su respuesta inmune específica, tanto en huéspedes sanos como en pacientes infectados por el VIH, no está totalmente establecida [1]. En el presente estudio, la respuesta serológica mostró la presencia de anticuerpos anti EBNA1 en 19 pacientes del grupo total, sugestivo de replicación viral activa, bien sea en etapas iniciales o pasadas de la infección; es importante resaltar que los anticuerpos IgM anti EBNA1 aparecen en la fase aguda de la infección por el EBV, más precozmente, con títulos más elevados y por un

período de tiempo más prolongado que los IgM anti CVA, los cuales además, se caracterizan por su breve persisten-

cia en sangre en pacientes menores de cuatro años de edad [14].

Tabla 1. Valores promedio de carga viral (VIH y de linfocitos T CD4+ según carga viral del EBV, en sangre periférica. Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica. Unidad de Investigaciones en Inmunología Clínica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 2005-2006

| Carga viral EBV (Copias/ml) | Carga viral VIH (LOG ¹⁰ X ± S) | Linfocitos T CD4+ (%) |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| No detectable (n= 3) | 3,49 ± 0,92 | 38,13 ± 4,2 |
| Detectable (n= 18) | 3,81 ± 1,77 | 23,83 ± 10,32 |
| Significación estadística | t= ±0,304; g.l = 19 p<0,764 (n.s)* | t= ±0,2325; g.l = 19; p<0,031 (s)** |

*Sin diferencia significativa (P>0,05).

**Diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

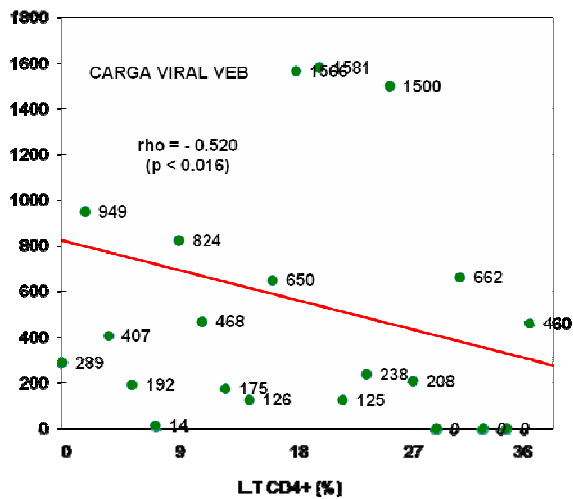


Figura 1. Coeficiente de correlación Spearman (Rho de Spearman): Carga viral EBV (Copias/ml) y porcentaje de linfocitos TCD4+ en sangre periférica. Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica. Unidad de Investigaciones en Inmunología Clínica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 2005-2006.

Un alto porcentaje de pacientes con infección pasada presentaron carga viral para el EBV en sangre periférica. En controles sanos las células T CD4+ específicas anti EBNA1 pueden organizar y mantener el control inmune específico contra el EBV y más aún, servir como efectoras contra células potencialmente malignas relacionadas con esta infección [12]. Heller y col [5], reportaron que el control inmune protector de las infecciones crónicas virales, como la del EBV, incluye un reservorio importante de linfocitos T CD4+ con respuestas tipo TH1, que contienen, adicionalmente a las células T ayudadoras para la activación de linfocitos T citotóxicos específicos efectoras, un porcentaje de células con fenotipo de memoria efectoras y con capacidad para producir rápidamente interferón en presencia de EBNA1. Por lo tanto, no es de extrañar que en niños portadores de alteraciones de los linfocitos T,

ya sean congénitas o adquiridas, la infección por el EBV sea generalmente crónica activa, con altos niveles del virus en sangre periférica [15].

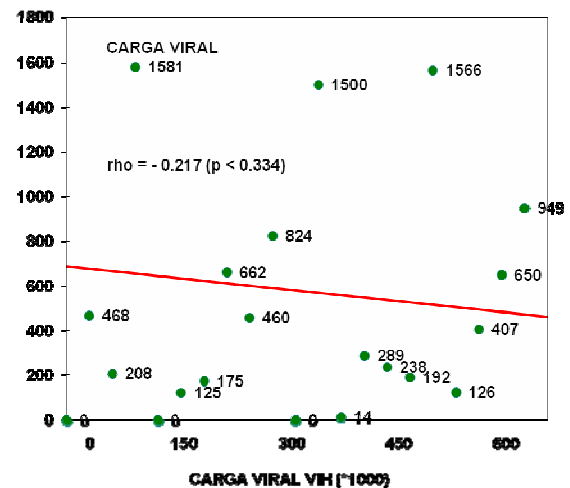


Figura 2. Coeficiente de correlación de Spearman (Rho de Spearman): Carga viral EBV y VIH (Copias/ml) en sangre periférica. Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica. Unidad de Investigaciones en Inmunología Clínica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 2005-2006.

En los pacientes infectados con el VIH, las cargas virales de EBV son más altas que en los controles sanos, con promedios mayores de células circulantes infectadas por el virus, así como también una disminución de la frecuencia de células CD4+ y CD8+ de memoria específicas anti EBV, sobre todo en pacientes no tratados [16-20].

Sin embargo, en relación con este último punto, Bekker y col [21], al estudiar una población de niños y adolescentes infectados por el VIH y recibiendo TARAE, demostraron que los linfocitos T CD8+ específicos contra antígenos del EBV, se encontraban en un porcentaje similar al de los controles sanos concluyendo que en estos pacientes proba-

blemente exista una falla en el nivel de reactividad de las células T CD4+ específicas para el EBV. En esta investigación, las mayores cargas virales para el EBV se encontraron entre los pacientes con menor número de linfocitos T CD4+.

Tabla 2. Valores promedio de carga viral (EBV) según fase temprana o tardía de la infección aguda.

Unidad de Investigación de Infectología Pediátrica. Unidad de Investigaciones en Inmunología Clínica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela, 2005-2006.

| Infección aguda (IgM anti CVA +/- ; anti EBNA 1 + IgG anti EBNA 1 - ; anti CVA +/-) Carga viral presente | Carga viral EBV (Copias/ml) |
|---|--------------------------------|
| Temprana (IgM ANTI CVA+ ANTI EBNA1+) | 994,00±830,14 |
| Tardía (IgM ANTI CVA- ANTI EBNA1+) | 507,00±605,90 |

P>0,05

Autores como Fellner y col [22], señalaron que la carga viral del virus EB disminuye cuando los contajes de linfocitos CD4+ caen a menos de 50 por mm³. Legoff y col [28], en un estudio realizado en Francia, concluyeron que en pacientes infectados por el VIH las cargas virales para EBV eran significativamente superiores a los que presentaban contajes bajos de CD4+ bajos. Adicionalmente se ha descrito que el TARAE en pacientes VIH, que es seguido de un aumento de los linfocitos T CD4+, puede ocasionalmente asociarse con un incremento de las cargas virales para el EBV, pues la reconstitución inmune durante el tratamiento antirretroviral puede incrementar la estimulación de los linfocitos B y por ende el número de células B infectadas [23,24].

Kimura y col [25] publicaron recientemente que en pacientes con enfermedad crónica activa por el EBV, los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) son infectados por el virus [8]. Si bien entre los pacientes aquí estudiados con menores porcentajes de linfocitos T CD4+, a pesar del TARAE, se encontraron las mayores cargas virales para el EBV, no es posible demostrar hasta qué punto la infección por dicho virus contribuye directamente con este descenso.

En portadores sanos, el EBV se reactiva periódicamente en el tejido linfoide asociado a las mucosas, por lo que el DNA viral puede ser detectado en sangre o tejidos, sin que necesariamente su presencia sea sinónimo de enfermedad relacionada con el virus. Debido a que los hallazgos serológicos pueden subestimar la frecuencia de reactivaciones asintomáticas del virus, se ha reportado que la detección de ADN del EBV en suero de pacientes inmunosuprimidos puede ser usada como un marcador de laboratorio de enfermedad activa por el EBV [1,26,27]. En pacientes con VIH este virus se reconoce por su capacidad para producir severas complicaciones, frecuentemente malignas, debido

a las fallas en la inmunovigilancia específica del hospedero para el EBV [28]; sin embargo, en relación con este punto, es importante señalar que los valores absolutos de carga viral aparentemente tienen poco valor diagnóstico para definir el riesgo de desarrollar complicaciones relacionadas con el EBV en pacientes VIH positivos: su valor pronóstico debe ser estudiado en estudios de cohortes por períodos de tiempo más prolongados antes de afirmar cualquier tipo de conclusión [20,29]. Ningún paciente para el momento de su inclusión en este trabajo tenía manifestaciones clínicas de enfermedad aguda órgano específica por el EBV, así como tampoco enfermedades malignas relacionadas con dicho virus. Por otra parte, aunque se ha reportado que en los huéspedes normales las cargas virales del EBV son más altas en las infecciones agudas, en comparación a las infecciones pasadas, entre los pacientes aquí investigados no hubo diferencias significativas entre los casos agudos o crónicos activos, aunque se observó una tendencia a la disminución de las cargas cuando la infección avanzó en el tiempo [16].

Como se indicó anteriormente, en la mayoría de las publicaciones se reporta que la carga viral del EBV es más alta en pacientes infectados con el VIH que entre los controles sanos [17-19, 30]. Otros autores afirman que la carga viral para el EBV en pacientes HIV positivos al inicio de la TARAE es similar a la de pacientes HIV negativos infectados en forma aguda por el virus [1]; sin embargo no se ha demostrado la existencia de una relación significativa entre los valores absolutos del ADN del EBV en sangre periférica y la del VIH, así como tampoco con su replicación ni con los estadios clínicos de la infección por este virus [15]. Estos resultados concuerdan con lo encontrado entre los pacientes estudiados, donde la carga del EBV en sangre periférica no se relacionó en forma significativa con la del VIH; por otra parte, se han descrito en pacientes infectados por el HIV fluctuaciones a lo largo del tiempo en la carga viral en células mononucleares de sangre periférica para el EBV, con variaciones individuales impredecibles, lo cual indicaría el poco valor predictivo de su cuantificación en la progresión de los pacientes hacia el SIDA [20,29]; tampoco se han encontrado diferencias de la carga viral del EBV en células mononucleares de sangre periférica entre los pacientes que reciben TARAE y aquellos sin tratamiento, aunque aparentemente las altas cargas para el EBV inducen un retardo en la respuesta al tratamiento [17,31].

En conclusión, en los pacientes portadores del VIH, es fundamental realizar la cuantificación del EBV en sangre periférica, ya que la serología por sí sola no representa el estado de actividad de la infección por el EBV. Dado el alto porcentaje de pacientes con cargas virales para el EBV encontrados en esta investigación, se sugiere la realización del seguimiento de los mismos, para identificar hasta qué punto el sistema inmune es capaz de clarificar el virus.

Referencias

1. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, Jabs WJ. Molecular parameters for precise di-

- agnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol.* 2005; 41: 5419-28.
2. Mujtaba S, Varma S, Sehgal S. Coinfection with Epstein Barr virus in North Indian patients with HIV/AIDS. *Indian J Pathol Microbiol.* 2005; 48: 349-53.
 3. Ikuta K, Satoh Y, Hoshikawa Y, Sairenji T. Detection of Epstein Barr virus in saliva and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect.* 2000; 2: 115-20.
 4. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Morishima T. Quantitative analysis of Epstein Barr virus load by using a real time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 132-6.
 5. Heller K N, Upshaw J, Seyoum B, Zebroski H, Münz C. Distinct memory CD4+ T-cell subsets mediate immune recognition of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in healthy virus carriers. *Blood.* 2007; 109: 1138-46.
 6. Leach CT, Sumaya C. Epstein Barr Virus. En: Feigin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S, editores. *Textbook of Pediatrics Infectious Diseases.* Fifth ed. USA: Saunders. 2004. p.1932-56.
 7. Thorley Lawson D. Epstein Barr Virus. En: K Frank Austen, Michael Frank, John Atkinson, Harvey Cantor, editores. *Samter's Immunological Diseases.* 6° ed. Philadelphia USA. 2001. pp: 970-85.
 8. Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C, Rozenbaum W, Vidaud M, Garbarg-Chenon A, Nicolas JC. Quantification of Epstein Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus infected patients using real time PCR. *J Med Virol.* 2001; 65: 543-52.
 9. West M. Structure and function of the Epstein Barr virus transcription factor, EBNA 3C. *Curr Prot Pept Sci.* 2006; 7:123-36.
 10. Xu ZG, Iwatsuki K, Oyama N, Ohtsuka M, Satoh M, Akiba H, Kaneko F. The latency pattern of Epstein Barr virus infection and viral IL10 expression in cutaneous natural killer T cell lymphomas. *Br J Cancer.* 2001; 84: 920-5.
 11. Snow A, Martinez O. Epstein Barr virus: evasive maneuvers in the development of PTLD. *Am J Transplant.* 2007; 7: 271-7.
 12. Münz C. Epstein Barr virus nuclear antigen 1: from immunologically invisible to a promising T cell target. *J Exp Med.* 2004, 199: 1301-4.
 13. Levine D, Milton RC, Parry MF, Klenk R, Morelli A, Hofreuter N. False positive Ebna IgM and IgG antibody test for infectious mononucleosis in children. *Pediatrics.* 1994; 94: 892-5.
 14. Valent Sumaya C, Ench Y. Epstein Barr virus infectious mononucleosis in children. II.- Heterophil antibody and viral specific responses. *Pediatrics.* 1985; 75:1011-9.
 15. Cameron B, Bharadwaj M, Burrows J, Fazou C, Wakefield D, Hickie I, Ffrench R, Khanna R, Lloyd A. Prolonged illness after infectious mononucleosis is associated with altered immunity but not with increased viral load. *J Infect Dis.* 2006; 193: 664-71.
 16. She RC, Stevenson J, Phansalkar AR, Hillyard DR, Litwin CM, Petti CA. Limitations of polymerase chain reaction testing for diagnosing acute Epstein Barr virus infections. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2007; 58: 333-5.
 17. Ling PD, Vilchez RA, Keitel WA, Poston DG, Sheng Peng R, White ZS, Visnegarwala F, Lewis D, Butel JS. Epstein Barr virus DNA in adult human immunodeficiency virus type 1 infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 1244-9.
 18. Legoff J, Amiel C, Calissonni O, Fromentin D, Rajoely B, Abuaf N, Tartour E, Rozenbaum W, Bélec L, Nicolas JC. Early impairment of CD8+ T cells immune response against Epstein Barr virus (EBV) antigens associated with high level of circulating mononuclear EBV DNA load in HIV infection. *J Clin Immunol.* 2004; 24: 125-34.
 19. Brengel Pesce K, Morand P, Schmuck A, Bourgeat MJ, Buisson M, Bargues G, Bouzid M, Seigneurin JM. Routine use of real time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein Barr virus infections. *J Med Virol.* 2002; 66: 360-9.
 20. Van Baarle D, Wolthers KC, Hovenkamp E, Niesters HG, Osterhaus AD, Miedema F, Van Oers MH. Absolute level of Epstein Barr virus DNA in human immunodeficiency virus type 1 infection is not predictive of AIDS-related non Hodgkin lymphoma. *J Infect Dis.* 2002; 183: 405-9.
 21. Becker V, Scherpbier H, Beld M, Piriou E, Van Breda A, Lange J, Van Leth F, Jurriaans S, Alders S, Wertheim van Dillen P, Van Baarle D, Kuijpers T. Epstein Barr virus infects B and non B lymphocytes in HIV-1 infected children and adolescents. *J Infect Dis.* 2006; 194: 1323-30.
 22. Fellner MD, Durand K, Correa RM, Redini L, Yampolky C, Colobraro S, Sevlever G, Teyssie AR, Benetucci J, Picconi MA. Circulating Epstein Barr virus (EBV) in HIV infected patients and his relation with primary brain lymphoma. *Int J Infect Dis.* 2007; 11: 172-8.
 23. Lechowicz MJ, Lin L, Ambinder RF. Epstein Barr virus DNA in body fluids. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14: 533-7.
 24. Righetti E, Ballon G, Ometto L, Cattelan AM, Menin C, Zanchetta M, Chieco Bianchi L, De Rossi A. Dynamics of Epstein Barr virus in HIV 1 infected subjects on highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2002; 16: 63-73.
 25. Kimura H, Hoshino Y, Hara S, Sugaya N, Kawada J, Shibata Y, Kojima S, Nagasaka T, Kuzushima K, Morishima T. Differences between T cell type and natural killer cell type chronic active Epstein Barr virus infection. *J Infect Dis.* 2005; 191:531-9.
 26. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis.* 2001; 3: 79-8.
 27. Okay TS, Del negro GM, Yamamoto L, Raiz Junior R. Detection of EBV-DNA in serum samples of an immunosuppressed child during a three years follow-up: association of clinical and PCR data with active infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47: 99-102.
 28. O'Sullivan CE, Peng R, Cole KS, Montelaro RC, Sturgeon T, Jenson HB, Ling PD. Epstein-Barr virus and human immunodeficiency virus serological responses and viral burdens in HIV-infected patients treated with HAART. *J Med Virol.* 2002; 67: 320-6.
 29. Stevens SJ, Blank BS, Smits PH, Meenhorst PL, Middeldorp JM. High Epstein Barr virus (EBV) loads in HIV infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS.* 2002; 16: 993-1001.
 30. Panagiotakis SH, Soufla G, Baritaki S, Sourvinos G, Passam A, Zagoreos I, Stavrianeas N, Spandidos DA. Concurrent CMV and EBV DNAemia are significantly correlated with a delay in the response to HAART in treatment naive HIV type 1 positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007; 23: 10-18.
 31. Fan H, Kim SC, Chima CO, Israel BF, Lawless KM, Eagan PA, Elmore S, Moore DT, Schichman SA, Swinnen LJ, Gulley ML. Epstein Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med Virol.* 2005; 75: 59-69.