



Detección y Respuesta Inmune de virus herpes humano 6 (HHV-6) y virus herpes humano 7 (HHV-7) en población sana

Patricia Biganzoli.

Tesis- Maestría en Salud Pública. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas.
Cátedra de Bacteriología y Virología Médica; 2015.

Aprobada: 2015

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Detección y Respuesta Inmune de virus herpes humano 6 (HHV-6) y virus herpes humano 7 (HHV-7) en población sana by Biganzoli Patricia is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

“DETECCIÓN Y RESPUESTA
INMUNE DE VIRUS HERPES
HUMANO 6
(VHH~6) Y VIRUS HERPES
HUMANO 7 (VHH~7) EN
POBLACIÓN SANA”.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

*“DETECCION Y RESPUESTA INMUNE DE VIRUS
HERPES HUMANO 6 (VHH-6) Y VIRUS HERPES
HUMANO 7 (VHH-7) EN POBLACIÓN SANA”.*

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Medicina y
Cirugía.

MÉDICA PATRICIA BIGANZOLI

Córdoba, República Argentina

2015

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

DIRECTOR: PROF. DR. JORGE V PAVÁN

INTEGRANTES: PROF. DRA. SILVIA V NATES

PROF. DR. ELÍAS P CHALUB

Trabajo realizado en:

Instituto de Virología “Dr JM Vanella”.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Cátedra de Bacteriología y Virología Médica.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

RHCD 4502/2011

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en
Medicina y Cirugía:

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE
SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”.

DEDICATORIA

*A mi esposo Gabriel y a mis hijos Emilio,
Camila y Federico...que son la razón y la
inspiración de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Como poner en palabras lo que significa para mí este momento en el que cierro otra etapa de mi vida.

Sorprendentes son los caminos por los cuales nos toca transitar, con mayores o menores dificultades, pero sin duda ese camino no lo hacemos solos.

Dios ha puesto personas muy valiosas a lo largo de mi vida que me han ayudado a crecer, a formarme y a ser quien soy hoy.

A mis padres y a mi hermana, mi amiga con mayúsculas, siempre cerca, siempre confiando.

A mi esposo y a mis hijos, que sepan que se puede, que los sueños se alcanzan, que nada queda tan lejos, que no hay que bajar los brazos, que Dios nos da la fortaleza para no desistir.

A mi director de tesis, responsable de que haya llegado hasta acá, que me inició en este camino, supo esperarme pacientemente y aconsejarme prudentemente.

A la Dra Silvia Nates y a el Dr Elías Chalub, por el acompañamiento en este camino.

A las maravillosas personas que conforman la Cátedra de Bacteriología y Virología Médica, mi refugio, por el cariño, la paciencia y el apoyo que me han dado desde que siendo estudiante comencé como ayudante alumno. Quiero que sepan que a cada uno de ellos me une un sentimiento particular.

A los profesionales del Instituto de Virología a quienes he tratado en estos años, de quienes sólo recibí apoyo, afecto y enseñanzas con total desinterés.

A mis amigas y amigos de la vida, a quienes llevo en mi corazón, algunos están cerca y me acompañan en mis días, otros están lejos, porque la vida nos llevó por diferentes caminos, pero todos importantes, todos partícipes de lo que soy. Infinitamente agradecida a cada uno de ellos.

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| Capítulo 1 INTRODUCCIÓN GENERAL | 15 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1.2 OBJETIVOS | 32 |
| Capítulo 2 MATERIAL Y MÉTODOS | 33 |
| 2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL | 34 |
| 2.2 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN VIRAL EN MUESTRAS DE SALIVA Y PLASMA | 37 |
| 2.2.1 Extracción de ADN | 37 |
| 2.2.2 Detección de ADN viral de VHH-6 y VHH-7 en muestras de saliva y plasma | 37 |
| 2.2.3 Tipificación de las especies de HHV-6 en muestras de plasma | 39 |
| 2.2.3 a Tipificación de VHH-6A en muestras de plasma. Técnica de PCR | 39 |
| 2.2.3 b Tipificación de VHH-6B en muestras de plasma. Técnica de PCR | 40 |
| 2.3 DETECCIÓN Y TITULACIÓN DE IGG ESPECÍFICA Y DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE ISOTIPO DE IGG ESPECÍFICA PARA VHH-6 Y VHH-7 (IGG1, IGG2, IGG3 e IGG4) | 42 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.1 Estandarización de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos tipo IgG anti VHH-6 y anti VHH-7 | 42 |
| 2.3.2 Detección de IgG anti VHH-6 y anti VHH-7 en suero problema | 51 |
| 2.3.3 Detección de isotipos de IgG anti VHH-6 y anti VHH-7 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) en suero problema | 51 |
| 2.3.4 Interpretación de IFI | 52 |
| | |
| 2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 54 |
| | |
| 2.5 APROBACIÓN DE PROYECTO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO | 55 |
| | |
| Capítulo 3 RESULTADOS | 63 |
| | |
| 3.1 RESULTADOS DEL MODELO TRANSVERSAL | 64 |
| 3.1.1 Detección de IgG específica anti VHH-6 y anti VHH-7 en muestras de suero | 65 |
| 3.1.2 Caracterización del perfil de isotipos de IgG específica (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) para VHH-6 y VHH-7 en muestras de suero | 69 |
| 3.1.3 Detección de ADN genómico de VHH-6 B y VHH-7 en muestras de saliva y plasma | 71 |
| | |
| 3.2 RESULTADOS DEL MODELO LONGITUDINAL | 76 |
| 3.2.1 Caracterización del perfil de isotipos de IgG específica (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) para VHH-6 y VHH-7 en muestras de suero. | 77 |
| 3.2.2 Detección de ADN viral de VHH-6 B y VHH-7 en muestras de saliva y plasma | 78 |
| 3.2.3 Determinaciones individuales del seguimiento | 79 |

| | |
|-----------------------------------------------|-----------|
| Capítulo 4 DISCUSIÓN | 85 |
| 4.1 CONCLUSIONES | 96 |
| Capítulo 5 BIBLIOGRAFÍA | 98 |
| PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTE TRABAJO DE TESIS | 108 |

RESUMEN

El *Herpesvirus Humano 6 (VHH-6)* y el *Herpesvirus humano 7 (VHH-7)* pertenecen a la familia *Herpesviridae* con una amplia distribución en la población humana.

La infección primaria ocurre a muy temprana edad, antes de los 2 años de vida, y el virus establece, en el hospedero susceptible, un modelo persistente de infección. La latencia del virus se produce en las células linfoides y en las glándulas salivales.

La reactivación puede suceder en reiteradas ocasiones a lo largo de la vida de un infectado, ya sea éste inmunocompetente o inmunocomprometido, pudiendo el virus ser detectado en saliva y /o plasma. En individuos sanos, inmunocompetentes, la historia natural de la infección es poco conocida.

El objetivo de este trabajo es contribuir a la comprensión de los modelos de persistencia viral de HHV-6 y de HHV-7 y de la respuesta inmune que la actividad viral desencadena en el hospedero sano, la cual se pone en evidencia por el perfil de isotipos específico de Inmunoglobulina G (IgG) específicos.

Se desarrollaron dos modelos experimentales, uno transversal y otro longitudinal, que permitieron estudiar el comportamiento de estos virus a lo largo del tiempo.

Para el modelo transversal la población estudiada fue categorizada en dos grupos, A y B según la edad, con una media de 36 años y 79 años respectivamente.

Para el modelo longitudinal la población fue estudiada durante 18 meses obteniéndose las muestras a intervalos regulares de tiempo. Se obtuvieron muestras de saliva, plasma y suero. En las muestras de saliva y plasma se realizó, mediante la técnica de Nested PCR (Reacción en cadena de la polimerasa anidada), la detección de ADN genómico para HHV-6 y para HHV-7. En las muestras de suero, mediante la técnica de inmunofluorescencia (IFI), se realizó la titulación de inmunoglobulina G (IgG) específica y la caracterización del perfil de isotipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) para ambos virus.

A partir de los resultados obtenidos en el modelo transversal se determinó la presencia de ADN genómico de HHV-6 en las muestras de plasma del grupo B, mientras que el ADN de HHV-7 pudo ser detectado tanto en saliva como plasma en ambos grupos. El perfil de isotipos fue caracterizado en ambas poblaciones estudiadas, observándose un comportamiento diferente de ambos virus.

El HHV-6 y el HHV-7, desarrollan modelos de infección distintos, los cuales tienen la impronta de los grupos etarios, tanto en la detección de ADN viral como en la respuesta inmune cuantitativa y cualitativa (IgG1, IgG3 e IgG4).

El HHV-6 establece en la población adulta un modelo de latencia definido por la detección de ADN viral en las muestras de saliva y una respuesta inmune isotípica con un perfil IgG1, mientras en la población adulto mayor, un modelo de cronicidad, definido por la detección de ADN viral en las muestras de plasma y una respuesta inmune isotípica con un perfil de isotipos IgG1, IgG3 e IgG4.

El HHV-7 establece un modelo de cronicidad tanto en el grupo adulto como en el de adulto mayor, definido por la detección de ADN viral en las muestras de saliva y plasma.

El modelo longitudinal confirmó los hallazgos del modelo transversal tanto para HHV-6 como para HHV-7.

ABSTRACT

Human herpesvirus 6 (HHV-6) and *Human herpesvirus 7* (HHV-7) belong to the *Herpesviridae* family and are widely distributed among the human population.

The human primary infection occurs early, before the two years of age, and the virus establishes a persistent model of infection in the susceptible host. The virus remains latent mainly in lymph cells and salivary glands. Reactivation may occur several times throughout the life of infected individual, whether immune competent or immune compromised, with the virus being detected in saliva and/or plasma. In healthy immune competent individuals, the natural history of the infection is little known.

The aim of this research was to contribute to the understanding of the models of viral persistence of HHV-6 and HHV-7 and the immune response that viral activity triggers in the healthy host, manifested by the profile of specific IgG isotypes (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4).

Two experimental models, one transverse and other longitudinal were developed, which enabled these viruses' behavior to be observed overtime. For the transverse model, the study population was categorized by age in two groups, A and B, with means of 36 and 79 years, respectively. For the longitudinal model, the population was studied during 18 months, collecting samples of saliva, plasma and serum at regular intervals. The Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) technique was used in the saliva and plasma samples to detect genomic viral DNA for HHV-6 and HHV-7. With the serum samples, immune fluorescence (IIF), titration of specific immunoglobulin G (IgG) and the characterization of the IgG isotype profile (IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4) were carried out for both viruses.

The results obtained with the transverse model showed the presence of genomic DNA of HHV-6 only in plasma samples from group B, while HHV-7 genomic DNA was detected in saliva and plasma samples from both groups. The isotype profile was characterized in both groups showing different behaviors for each virus type.

HHV-6 and HHV-7 developed different models of infections, reflecting the age groups, both in the detection of viral DNA and in the quantitative and qualitative immune response (IgG1, IgG3 and IgG4). In the adult group, HHV-6 established a latency model defined by the detection of viral DNA in the saliva samples and an isotype immune response with an IgG1 profile, while in the older group, it established a chronic model, defined by the detection of viral DNA in the plasma samples and an isotype immune response with IgG1, IgG3 and IgG4. HHV-7 established a chronic model in both groups, defined by the detection of viral DNA in the saliva and plasma samples.

The longitudinal model confirmed the findings of the transverse model in both HHV-6 and HHV-7.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

La infección viral en un hospedero, que posee numerosos tejidos y órganos especializados, es sin duda un proceso muy complejo. El virus tiene que invadir cada sitio específico lo cual determinará en parte, su vía de diseminación y el posible acceso a diferentes clones celulares. Para ello debe poseer una “flexibilidad” que le permita encontrar diferentes receptores y correceptores que le faciliten la infección de la célula.

A partir del descubrimiento del primer virus, el virus del Mosaico del Tabaco en 1892, (1), se ha mantenido un interés creciente en el estudio de las relaciones entre virus y hospederos. El advenimiento de las técnicas de biología molecular abrió una importante “ventana” en la comprensión de la complejidad de estas interacciones.

El virión es una estructura biológica metaestable, pues en contacto con su receptor, varía la cohesión de sus subunidades lo que le permite interactuar con la célula y penetrar en ella a través de los más variados y creativos mecanismos. De este modo, cuando encuentra una célula con receptores adecuados, experimenta cambios en su estructura molecular, que le permiten utilizar los mecanismos de tráfico intracelular. Es en este estado en el que sus componentes, ahora dispersos en la célula, son distintos a la estructura que antes lo caracterizaba. Ahora, el llamado virus, si la célula es permisiva, tiene la posibilidad de continuar su replicación y utilizar las diferentes vías metabólicas celulares. Estas rutas metabólicas pueden tanto posibilitar como restringir su capacidad reproductiva. Si el virus se multiplica y acumula en la célula, ésta cambia su fenotipo, se produce la lisis celular y la liberación de numerosos viriones que inician la búsqueda de un nuevo hospedero. En estas circunstancias el virus se transmite entre hospederos que aún no han tenido contacto con el microorganismo y en el tiempo, este sistema así planteado, podría conducir a la eliminación del virus. En otros términos, la respuesta inmune luego de la infección dejaría al virión sin hospederos susceptibles.

Éste modelo de replicación limitado en el tiempo, caracteriza una infección aguda viral, donde se produce una intensa replicación y una elevada producción de partículas virales.

Sin embargo, otras interacciones pueden establecerse entre el virus y el hospedero, en las cuales, luego del ingreso de la partícula viral, acontecen situaciones diametralmente opuestas, esto es la disminución o desaparición de la síntesis de proteínas virales. Esta situación muestra al agente como en “espera”; de hecho, en el reino animal, numerosos predadores esperan la presa y otros animales hibernan cuando las condiciones no son favorables. Es así que refiere Katze y col., “no debiera sorprendernos que algunos microorganismos *esperan* en el hospedero momentos favorables para su reproducción” (2). Algunos virus, luego de la infección aguda, también esperan en el hospedero como una parte de su ciclo de multiplicación. Esta espera es un mecanismo evolutivo utilizado por algunos linajes virales, en particular por los virus ADN. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que son virus que poseen un genoma viral grande, que replican en el núcleo de la célula eucariota y que han tenido por lo tanto, a lo largo de la evolución, la posibilidad de adquirir genes del hospedero y a partir de esto mimetizar, bloquear y regular procesos celulares, los cuales inciden directamente en la sobrevivencia del virus y en la posibilidad de aumentar su diseminación célula a célula. Las interacciones que así se generan con el hospedero se prolongan en el tiempo sin que se produzca compromiso del estado de salud del individuo (3).

Tal es el ejemplo de los virus agrupados en la familia *Herpesviridae*, que remontan su origen a 400 millones de años atrás (4). A diferencia de otras especies virales que han evolucionado rápidamente diseminando nuevos genotipos en las poblaciones susceptibles, los herpesvirus se han mantenido relativamente estables en sus hospederos naturales (5). Históricamente la familia *Herpesviridae*, ha sido definida basándose en la arquitectura del virión. Un típico herpesvirus está constituido por (i) core, que contiene un ADN lineal de doble cadena que rápidamente se circulariza dentro del núcleo cuando es liberado (6, 7, 8), (ii) cápside, icosaédrica de 125 nm de diámetro que contiene 161 capsómeros (8), (iii) tegumento, material amorfo, de espesor variable, de estructura proteica, que se ubica entre

la nucleocápside y la envoltura y que contiene más de 20 proteínas codificadas por el virus (9) y (iv) la envoltura, una estructura trilaminar, que deriva de restos de la membrana celular de la célula hospedadora y que obtiene a medida que se produce el ensamblaje y liberación de los virus. Posteriormente el virus la modifica al insertar sus glicoproteínas (10).

Los Herpesvirus están ampliamente distribuidos en la naturaleza, tan es así, que la mayoría de las especies animales son portadores de al menos uno. Si bien hasta el momento se han identificado 200 tipos diferentes, 9 han sido reconocidos como patógenos humanos: *Herpes simplex 1* (HSV-1), *Herpes simplex 2* (HSV-2), *virus Varicela-zoster* (VZV), *virus de Epstein-Barr* (EBV), *Citomegalovirus humano* (HCMV), *Herpesvirus humano-6A y 6B* (HHV-6A, HHV-6B), *Herpesvirus humano-7* (HHV-7) y *Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi* (HHV-8).

De la misma manera que comparten la estructura que los caracteriza y agrupa, comparten propiedades biológicas tales como: (i) poseer una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo y síntesis del ADN viral, así como en el procesamiento de las proteínas, (ii) la transcripción de los genes, la síntesis del ácido nucleico, así como el ensamblaje de la cápside ocurre en el núcleo, mientras que una parte del tegumento y de la envoltura la adquieren en el citoplasma, (iii) la producción de la progenie viral se acompaña, generalmente, con la destrucción de la célula infectada y finalmente (iv) establecen un estado de latencia como mecanismo para persistir durante toda la vida del hospedero.

Originalmente clasificados en una única familia, la posibilidad actual de conocer las secuencias nucleotídicas permitió establecer un nuevo orden: los *Herpesvirales* (11, 12), que incorpora tres familias virales: *Herpesviridae* (que infectan mamíferos, aves y reptiles), *Alloherpesviridae* (que infectan peces y anfibios) y *Malacoviridae* (cuyos hospedero son los bivalvos).

- Orden *Herpesvirales*
 - Familia *Herpesviridae*
 - Familia *Alloherpesviridae*
 - Familia *Malacoviridae*

La familia *Herpesviridae*, a su vez, se divide en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*.

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* tiene un rango de hospederos variable, su ciclo de replicación es relativamente corto, se diseminan rápidamente en el cultivo, generan una efectiva destrucción de la célula hospedadora y establecen infecciones latentes principalmente, aunque no en forma exclusiva, en ganglios sensitivos.

La subfamilia *Betaherpesvirinae* tienen un rango restringido de hospederos, el ciclo reproductivo es largo y la infección progresa lentamente en los cultivos, las células infectadas frecuentemente sufren agrandamiento. Establecen infecciones latentes en glándulas salivales, riñón y linfocitos.

Finalmente la subfamilia *Gammaherpesvirinae* que “in vitro” replican en células linfoblastoides y algunos causan infecciones líticas en células epiteloides o fibroblásticas, suelen tener como blanco el tejido linfoide, en particular los linfocitos T o B (13).

Todos los miembros de esta familia tienen además en común, la capacidad de establecer con su hospedero susceptible un modelo de infección persistente, es decir, que el virus permanece en el interior de la célula en un estado de inactividad aparente, donde sólo va a expresar una pequeña cantidad de genes virales que codifican para algunas proteínas que son las que permiten la permanencia, esta situación también se denomina infección no productiva. A este estado de inactividad puede luego seguir un estado de reactivación, en el que se generan nuevas partículas virales completas e infectantes, también denominado infección productiva. Esta reactivación, que caracteriza el modelo latente, puede o no terminar en enfermedad ya que se combinan el daño celular y tisular producido directamente por la destrucción causada por el virus y la respuesta inmune del hospedero desencadenada por la replicación lítica (14).

Este trabajo de tesis ha centrado su mirada en el género *Roseolovirus*, integrado por *Herpesvirus humano-6 (HHV-6)* y *Herpesvirus humano-7 (HHV-7)*.

El HHV-6, fue aislado por primera vez en 1986 a partir de cultivos de células mononucleares de sangre periférica de seis pacientes que padecían diferentes desórdenes linfoproliferativos, los que incluían linfoma de células B, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, linfoma y leucemia linfocítica aguda. Estos cultivos manifestaban un efecto

citopático caracterizado por agrandamiento celular y /o células binucleadas con la presencia de inclusiones intranucleares y/o intracitoplasmáticas. Mediante microscopia electrónica se caracterizó la presencia de partículas virales cuyo nombre inicial fue Virus Linfotrópico B Humano (HBLV) (Figura 1,2) incluyéndolo en la por entonces familia *Herpesviridae* por sus características morfológicas (15, 16).

Resultados obtenidos posteriormente por diferentes laboratorios, indicaron que este nuevo virus descrito se multiplicaba en linfocitos T CD4⁺ (17, 18). Como resultado de estas observaciones se propuso el cambio de designación a *Virus herpes humano 6* (HHV-6), un nombre independiente del tropismo celular y en acuerdo con las disposiciones del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) (19, 20). Luego, a partir de diferentes aislamientos se reconocieron dos variantes, A (HHV-6A) y B (HHV-6B), basándose en las diferencias que involucran propiedades del crecimiento “in vitro”, en la longitud de los fragmentos de restricción que se obtuvieron de los estudios de polimorfismo, en la respuesta dada a anticuerpos monoclonales y en el tropismo celular (21).

En febrero de 2012, el ICTV, dispuso la creación de las especies *Herpesvirus humano 6A* y *Herpesvirus humano 6B* en el género *Roseolovirus* removiendo la designación de Herpesvirus humano 6 del género y designando al HHV-6A como especie tipo del género (22-25) quedando conformado el cuadro taxonómico del siguiente modo:

- Familia *Herpesviridae*
 - Subfamilia *Alphaherpesvirinae*
 - Género *Simplexvirus*
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano 1* (HSV-1)
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano 2* (HSV-2)
 - Género *Varicellovirus*
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano 3* (VZV)
 - Subfamilia *Betherpesvirinae*
 - Género *Citomegalovirus*
 - ❖ Especie *Herpes virus humano 5*
 - Género *Roseolovirus*
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano -6A* (HHV-6A)
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano-6B* (HHV-6B)
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano -7* (HHV-7)
 - Subfamilia *Gammaherpesvirinae*
 - Género *Lymphocryptovirus*
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano 4* (EBV)
 - Género *Rhadinovirus*
 - ❖ Especie *Herpesvirus humano 8* (KSVH)

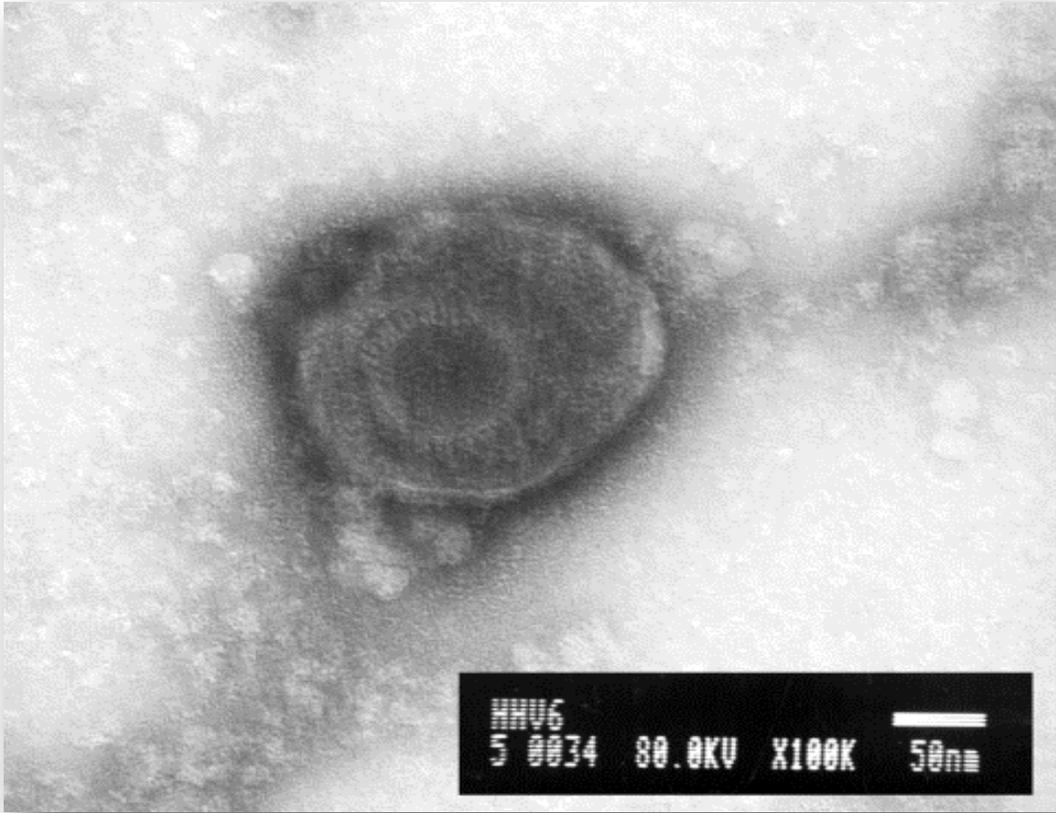


Figura 1. Microfotografía electrónica. Tinción con ácido fosfotúngstico. Morfología característica de un miembro de la familia *Herpesviridae*.

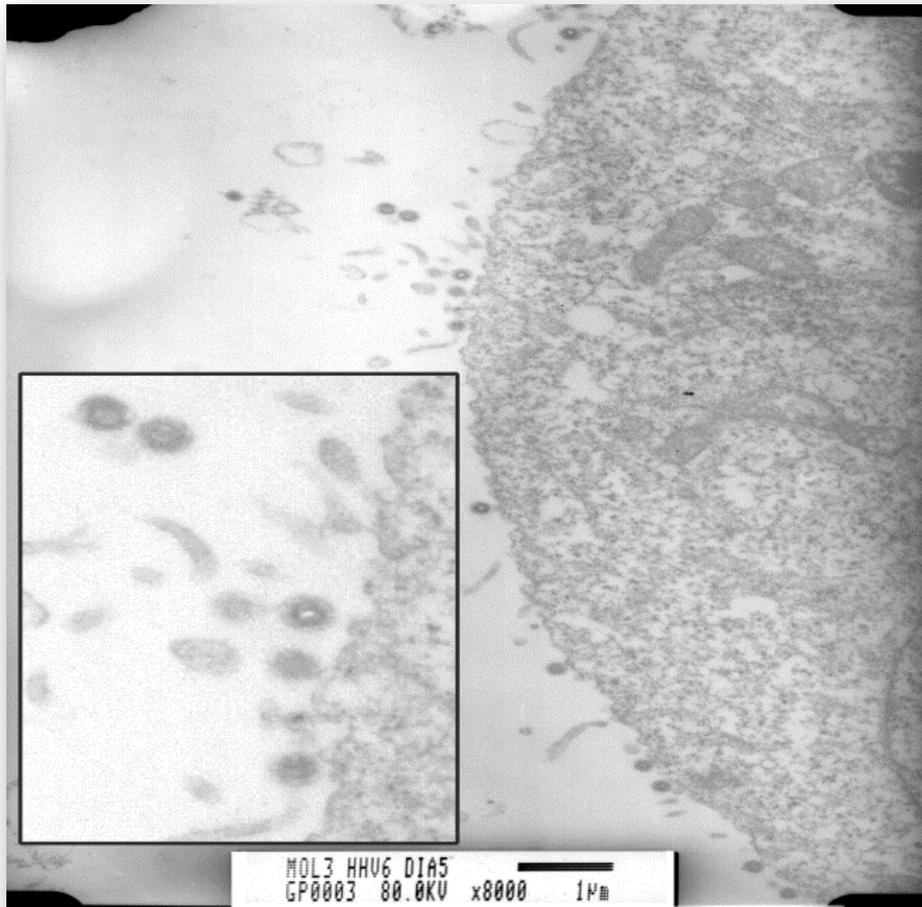


Figura 2. Microfotografía electrónica. Células linfoblastoides Molt3 infectadas con *Herpes humano-6* (HHV-6). En recuadro se observa la brotación de partículas virales en la membrana celular. Tinción con acetato de uranilo.

El HHV-7, fue aislado por primera vez en 1990 a partir de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica de individuos sanos, en el curso de una investigación para *Virus de la inmunodeficiencia humana*. Se observó que estos linfocitos, no infectados, manifestaban espontáneamente efecto citopático. Mediante el uso de enzimas de restricción y pruebas de hibridación se determinó que era diferente de HHV-6 y de otros herpesvirus. Siguiendo la taxonomía de la familia se la adjudicó el nombre de *Herpesvirus humano 7* (26).

Las especies HHV-6A, HHV-6B y HHV-7, están íntimamente relacionados desde lo epidemiológico y lo molecular, ya que tienen alta prevalencia en la población sana (más del 90%), establecen un modelo de infección persistente manifestando latencia en macrófagos y linfocitos T, son frecuentemente eliminados a través de la saliva de los individuos infectados (27), la primoinfección se produce en la primera infancia (antes de los 2 años) y su potencial patogénico puede variar entre frecuentes infecciones asintomáticas y raras situaciones de enfermedad severa (28, 29).

El primer sitio de replicación es el tracto respiratorio superior y las células linfocitarias presentes en las amígdalas y en el epitelio olfatorio de la cavidad nasal. El tropismo celular de HHV-6 son las células linfoideas, las células endoteliales, el hígado, el sistema nervioso central y las glándulas salivales. El tropismo celular de HHV-7 in vivo son los linfocitos T CD4⁺ y las células epiteliales de las glándulas salivales (30-32). La molécula receptora que favorece el ingreso del virus HHV-6 a las células, es CD46, glicoproteína tipo 1, que se expresa en la superficie celular de todas las células nucleadas y que pertenece a la familia de proteínas que regulan la activación del complemento (RCA) mientras que para HHV-7 es el CD4 (32).

La historia natural de la infección por HHV-6 y HHV-7 comienza con una infección primaria, productiva, caracterizada por un modelo agudo de replicación viral. En ésta, el virus que ha ingresado a través de la saliva en el momento del contacto, comienza a replicarse en las glándulas salivales del nuevo hospedero. Desde este sitio se produce una fase virémica que lo disemina a numerosos órganos como el sistema nervioso central, riñones, pulmones, nódulos linfáticos, médula ósea y los diferentes clones celulares del sistema inmune: linfocitos T, monocitos y células citotóxicas naturales (NK) (28). La primoinfección por HHV-6 y HHV-7, ocurre en la infancia. En la ciudad de Córdoba, se realizó un trabajo de

investigación, en el cual, a través de la titulación de inmunoglobulina G específica (IgG) contra HHV-6 y HHV-7 en muestras de suero de mujeres embarazadas y en niños entre 0 y 24 meses, se pudo determinar que ante la caída de los títulos de anticuerpos maternos se produce el ingreso de HHV-6 y HHV-7. El HHV-7 ingresa antes que el HHV-6, entre el mes 5 y el mes 8 de vida, con un patrón de circulación diferente al informado por países europeos y asiáticos. El HHV-6 lo hace entre los 12 y 15 meses de vida, con una prevalencia de anticuerpos IgG del 64%. Se determinó que los anticuerpos maternos tienen un carácter protector en los cuatro primeros meses de vida y que la respuesta inmune para HHV-7 no protege contra la primoinfección de HHV-6 que ocurre meses después (33-35).

La primoinfección puede ser asintomática, sin embargo, una proporción importante, que puede rondar el 40 al 48%, desarrolla un cuadro exantemático conocido como exantema súbito o roséola infantil (Figura 3) (36, 37), caracterizado por un período de incubación de 10 días seguido por un síndrome febril (39-40°C) que persiste 3-7 días luego de lo cual aparece un exantema eritemato-macular (similar a rubeola) o papular (similar a sarampión) que involuciona en 48hs.



Figura 3 Exantema súbito. Lesiones características de la infección producida por *Herpesvirus humano 6*.

También puede presentarse en forma menos característica con fiebre y convulsiones o trastornos gastrointestinales inespecíficos como diarrea y vómitos. La asociación con cuadros graves como meningoencefalitis, encefalitis o síndromes hematológicos es muy poco frecuente como manifestación de primoinfección (38-40). También están implicados en el síndrome mononucleósico, así como en complicaciones neurológicas y encefalitis tanto en inmunocompetentes como en inmunocomprometidos, ya que el sistema nervioso central es uno de los sitios blanco de estos virus (37, 41, 42). Algunos estudios vincularon al HHV-6 y el HHV-7 con la esclerosis múltiple, síndrome de fatiga crónica y el síndrome mesial temporal, aunque su papel como agente causal de estas patologías es controvertido (43, 44).

La principal vía de transmisión es horizontal a través de la saliva (45), aunque actualmente se reconocen otras fuentes probables como las secreciones nasales, las secreciones vaginales, que serían fuente de infección neonatal, y los órganos trasplantados de donantes infectados (37, 46). Se ha identificado una forma vertical de transmisión por cuanto el HHV-6 es capaz de integrarse al cromosoma de la célula eucariota y de esta manera establecer una infección hereditaria (47-51). Algunos estudios indican que el HHV-7 es detectado y aislado en muestras de saliva en más del 80% de individuos sanos de población general en contrapartida al HHV-6, para el cual se han reportado frecuencias de detección y aislamiento mucho menores (15-30%) (52, 53).

Luego de la primoinfección comienza la persistencia del virus, como una “espera”, y el hospedero no presenta sintomatología alguna. Durante la persistencia quedan los ácidos nucleicos del virus dentro de las células que ha parasitado. Esta persistencia incluye un estado de latencia verdadero, no productivo, donde no hay partículas virales completas (54,55) y uno de replicación crónica, donde hay una producción continua de partículas virales. Ambas formas de persistencia se desarrollan en el mismo individuo pero en poblaciones celulares distintas, esto es, la infección latente en células del sistema inmune como linfocitos T y células dendríticas y la infección crónica en las glándulas salivales (56, 57).

El papel patogénico de la persistencia del HHV-6 y del HHV-7 en las entidades clínicas asociadas no ha sido aclarado y, por lo tanto, se desconoce la real importancia de estos virus en la población humana sana.

La infección productiva en las glándulas salivales es el mecanismo que le permite a estos virus diseminarse a otros hospederos susceptibles a través de la saliva, desde donde ambos virus pueden ser aislados (58-60). La infección productiva, es decir, el período en el que el virus realiza ciclos de replicación completos dando origen a partículas virales infectantes, puede corresponder tanto a una primoinfección o a una reactivación desde la latencia.

En el caso de una primoinfección, esta etapa es caracterizada, desde el laboratorio, mediante la detección de anticuerpos específicos de tipo Inmunoglobulina M (IgM) o bien por un cambio significativo en la concentración de anticuerpos del tipo IgG, definiéndose esto último como seroconversión.

La reactivación desde la latencia, puede ocurrir tanto en inmunocompetentes como en inmunocomprometidos, siendo estos últimos, en quienes más se ha estudiado este proceso. Se incluyen en este grupo pacientes infectados con *Virus de la Inmunodeficiencia Humana* (VIH), trasplantados de médula ósea, riñón e hígado, así como pacientes con esclerosis múltiple, síndrome de fatiga crónica y de hipersensibilidad a drogas (43, 56, 61). Clínicamente el estado de reactivación se manifiesta con fiebre, exantema, neumonía intersticial, hepatitis, encefalitis y citopenias por supresión medular, así como el rechazo del injerto o fallo en el implante (62, 63).

La reactivación, puede ser caracterizada, a través de la detección de ADN viral en plasma, así como por la detección de IgG específica, buscando una respuesta cuantitativa mediante la determinación de título de IgG y conversión serológica.

Durante una infección viral el hospedero desarrolla una respuesta inmune adecuada a los patrones de expresión de proteínas virales y a la actividad viral, ya que las células del sistema inmune, en virtud del reconocimiento de ciertos antígenos virales, puede iniciar una respuesta de isotipos de IgG que será la más adecuada para el estímulo antigénico que recibe (64). El patrón de isotipos de IgG para HHV-6 pudo ser caracterizado, observándose su variación, según la actividad viral. En niños y adultos sanos el patrón de isotipos fue IgG1 mientras que en individuos trasplantados de médula ósea con seroconversión se caracterizó un perfil de isotipo IgG1 e IgG4 (65). Situación similar se observó en individuos con primoinfección por virus sarampión, en quienes la reactivación de HHV-6 caracterizó un perfil de isotipos IgG1 e IgG4, mientras que los controles mantuvieron un perfil IgG1.

De este modo la respuesta inmune cualitativa manifestada por el perfil de isotipos de IgG específicos resultó importante en la caracterización de la actividad viral para HHV-6 (66).

La IgG es el anticuerpo con mayor presencia en el suero (67), está constituida por cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, las cuales poseen diferentes propiedades biológicas (68), (Figura 4).

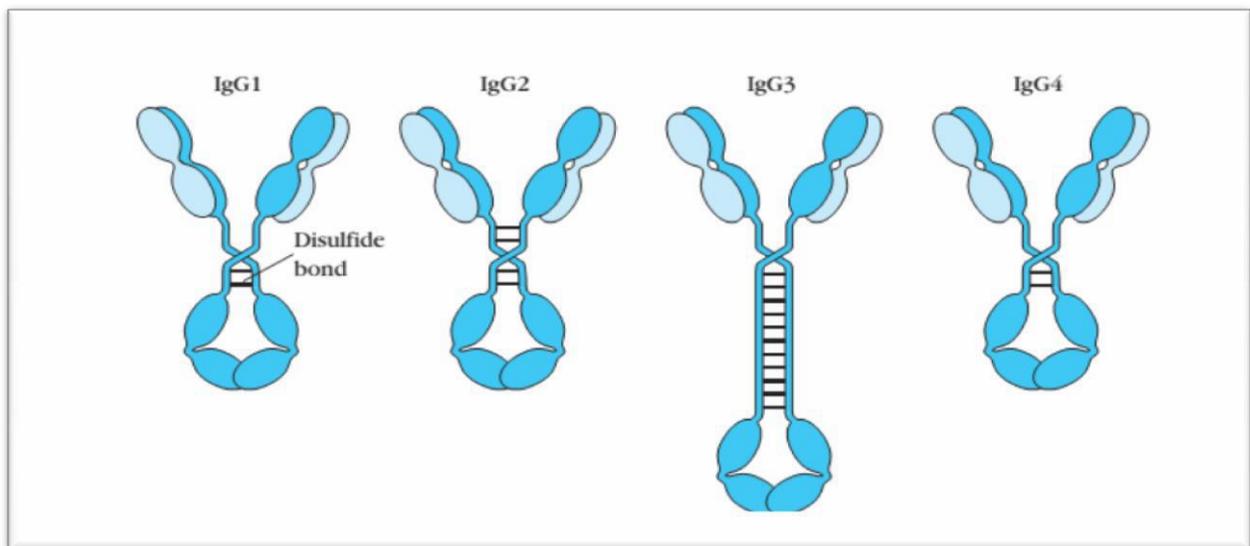


Figura 4. Estructura general de las cuatro subclases de IgG humana.

Cada una de ellas tiene un perfil de actividad particular y una diferente concentración en suero.

Los antígenos de conformación proteica generan respuesta IgG1 e IgG3 y ambos son capaces de activar todos los tipos receptores Fc así como al complemento mediante la activación de la fracción C1(69, 72). Aquellos constituidos por carbohidratos, generan una respuesta IgG2, que tiene la capacidad de actuar sobre la fracción C1 del complemento y así activarlo. Por último la IgG4 aparece en procesos donde se produce una estimulación crónica por parte del antígeno hacia el sistema inmune. Éste isotipo no tiene actividad sobre el complemento (71). En la tabla 1 se muestran las características de las cuatro subclases de IgG.

Tabla 1 Características de Subclases de IgG

| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| % de IgG totales | 60-70 | 20-30 | 5-8 | 1-3 |
| Peso molecular IgG (Da) | 146000 | 146000 | 170000 | 16000 |
| Peso molecular cadena H (Da) | 52000 | 52000 | 60000 | 52000 |
| Nº de a.a de la bisagra | 15 | 12 | 62 | 12 |
| Nº de puentes disulfuro intercatenarios | 2 | 4 | 12 | 2 |
| Vida media (ds.) | 21 | 21 | 7 | 21 |
| Marcadores alotípicos | 4-10 | 1 | 14 | - |
| Fijación de complemento | ++ | + | +++ | - |
| Unión a los receptores para FC | +++ | +/- | +++ | + |
| Formación de crioaglutininas | ++ | + | +++ | + |
| Unión a las proteína A | + | + | - | + |
| Transporte transplacentario | ++ | + | ++ | ++ |
| Ac anti polisacáridos | + | +++ | - | ++ |
| Ac anti proteínas | +++ | + | ++ | + |

Retomando el inicio de la introducción, algunos virus como HHV-6 y HHV-7, luego de la infección aguda, “esperan” en el hospedero como parte de su ciclo de multiplicación el momento para reactivarse. Esta persistencia viral, latencia y reactivación para HHV-6 y HHV-7 han sido poco caracterizadas en población sana. Lo que es más, la respuesta inmune de los diferentes isotipos de IgG para HHV-6 y HHV-7 en individuos sanos, no ha sido estudiada, así como tampoco, la historia natural de la infección en cuanto a detección de ADN viral en plasma y saliva.

El monitoreo cuantitativo de IgG específica y cualitativo de patrones de isotipos de IgG, así como la detección de ADN viral, pueden ser importantes para conocer la actividad de HHV-6 y HHV-7 en el marco de la historia natural de la persistencia en el hospedero inmunocompetente.

En definitiva el presente trabajo de tesis propone caracterizar la infección en individuos adultos sanos a través de la detección de ADN, analizando los patrones de la respuesta inmune que cada evento viral desencadena en el hospedero, a fin de contribuir a la comprensión de estos modelos y las consecuencias que esta persistencia puede acarrear si el individuo padece un estado de inmunocompromiso, tratando de anticipar posibles complicaciones.

La hipótesis del presente trabajo es que el hospedero desarrolla una respuesta de isotipos de IgG específica para HHV-6 y HHV-7 determinada por la actividad viral; es decir que el estadio del ciclo replicativo de HHV-6 y HHV-7 en glándulas salivales o en células del sistema inmune inducen un cambio en el patrón de isotipos de IgG específica.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- ✚ Realizar un aporte al conocimiento en la detección y respuesta inmune del *Herpesvirus humano 6* y del *Herpesvirus humano 7* en población sana, a fin de contribuir a la comprensión de los modelos de persistencia virales y de su relación con la respuesta inmune humoral.

Objetivos Particulares

- ✚ Estudiar la respuesta inmune de IgG total y de los diferentes isotipos para HHV-6 y HHV-7 en población sana.
- ✚ Analizar y caracterizar la presencia de ADN de HHV-6 y HHV-7 en saliva de individuos sanos.
- ✚ Caracterizar la presencia de ADN de HHV-6 y HHV-7 en plasma.
- ✚ Relacionar la presencia de ADN y virus en diferentes muestras biológicas con la respuesta inmune de IgG total y los diferentes isotipos para HHV-6 y HHV-7.
- ✚ Analizar y caracterizar la evolución en el tiempo de los distintos marcadores virales para HHV-6 y HHV-7.
- ✚ Anticipar posibles complicaciones en individuos sanos en contexto de situaciones de inmunocompromiso.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Diseño Experimental

El diseño experimental de este trabajo se llevó a cabo mediante el desarrollo de dos modelos, uno transversal y otro longitudinal (Figura 5).

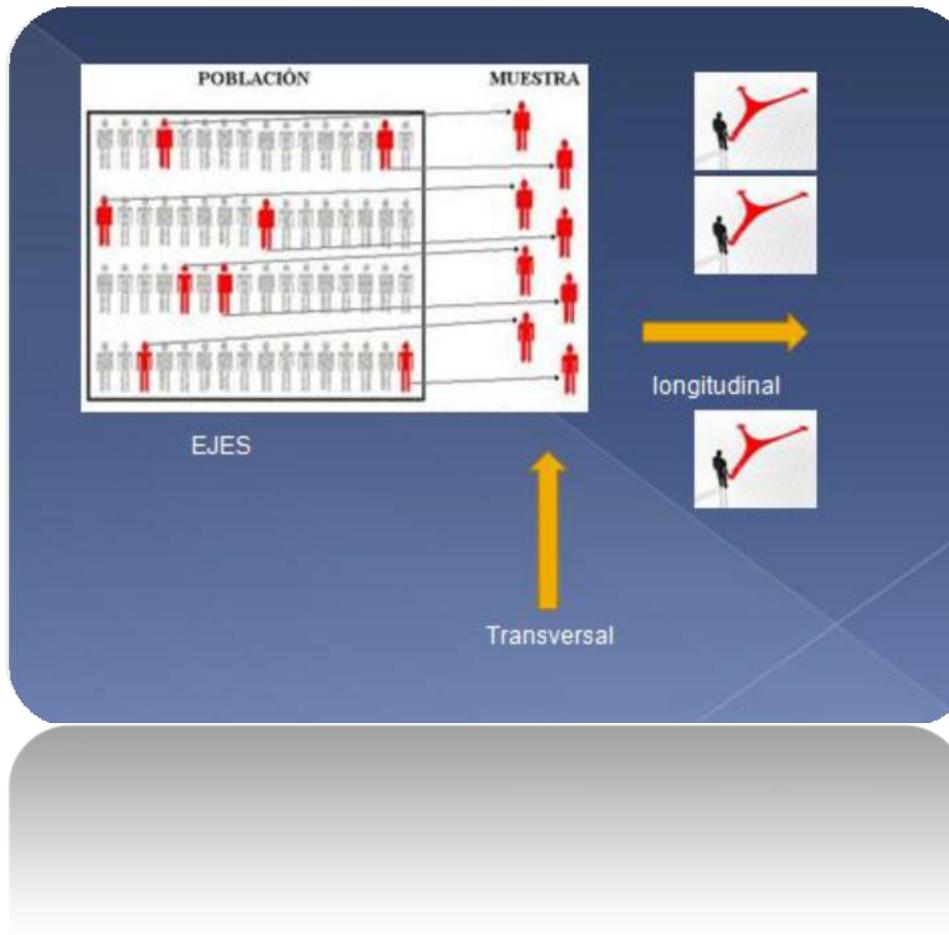


Figura 5: Esquematización del Diseño Experimental: Modelo Transversal y Modelo Longitudinal

Modelo Transversal

Poblaciones estudiadas: se incluyeron individuos adultos sanos, los que fueron incluidos, según la edad, en dos categorías: Grupo A: $n = 40$, con una edad media de 36 años y un rango entre 18-60 años ($n = 11$ pertenecientes al sexo femenino y $n = 29$ pertenecientes al sexo masculino). Esta población correspondió a donantes voluntarios de sangre, admitidos para tal fin por el Banco de Sangre de la Universidad Nacional de Córdoba. Los mismos fueron entrevistados posteriormente de su aceptación como tales y arbitrariamente denominados, en adelante, adultos. Grupo B: $n = 18$, con una media de 79 años y un rango entre 68 – 93 años ($n=10$ pertenecientes al sexo femenino y $n= 8$ al sexo masculino). Esta muestra correspondió a personas pertenecientes a una residencia geriátrica. Fueron admitidos por estar en buenas condiciones psicofísicas ya que podían deambular, relacionarse con el medio y abastecerse en sus necesidades básicas. Son denominados arbitrariamente en adelante adultos mayores.

Muestras: para el modelo transversal se obtuvieron muestras únicas de saliva, plasma y suero.

Modelo Longitudinal

Poblaciones estudiadas: en el modelo longitudinal se incluyeron individuos adultos, sanos, $n = 10$, con una edad media de 42 años y un rango entre 20-66 años ($n = 7$ pertenecientes al sexo femenino y $n = 3$ sexo masculino).

Muestras: para el modelo longitudinal se obtuvieron muestras seriadas de saliva, plasma y suero recogidas a intervalos regulares de tiempo (3 meses), durante 18 meses.

Las muestras de saliva fueron recolectadas por emisión espontánea en tubo estéril y conservadas a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre fueron fraccionadas para la obtención de suero y plasma en tubos estériles y conservados a -20°C hasta su procesamiento.

Se realizó la extracción de ADN viral de HHV-6 y HHV-7 a las muestras de saliva y plasma y posteriormente la detección de ADN genómico mediante la técnica de Nested PCR (Reacción en cadena de la polimerasa anidada).

En las muestras de plasma, en las que se detectó ADN viral correspondiente a HHV-6, se realizó la tipificación de las variantes A y B mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Las muestras de suero se procesaron para la titulación de IgG específica y la posterior caracterización de las subclases de IgG específicas: IgG1 HHV-6, IgG2 HHV-6, IgG3 HHV-6 e IgG4 HHV-6; IgG1 HHV-7, IgG2 HHV-7, IgG3 HHV-7 e IgG4 HHV-7 mediante la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

2.2 MÉTODO DE DETECCIÓN DE ADN VIRAL EN MUESTRAS DE SALIVA Y PLASMA

2.2.1 Extracción de ADN

El ADN viral fue extraído de las muestras de plasma y saliva utilizando el método de fenol- cloroformo. A 200µl de muestra se adicionó igual volumen de buffer de extracción (10 mmol/L Tris-HCL (pH 0,8), 5 mmol/L EDTA, 0,1% SDS) se agitó e incubó a temperatura ambiente 15 minutos. Luego se le agregó igual volumen de fenol cloroformo 1:1 y se incubó en baño húmedo a 56°C por 30 minutos. Luego de la incubación se centrifugó a 12000 x g por 30 minutos, se extrajo la fase acuosa y se mezcló con 2 volúmenes de alcohol isopropílico y se almacenó a – 20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 12000 x g durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en agua tridestilada estéril. El ADN así obtenido se almacenó a -20°C hasta la realización de la técnica de Nested PCR.

2.2.2 Detección de ADN viral HHV-6 y HHV-7 en muestras de saliva y plasma.

Técnica de Nested PCR

La detección del ADN viral en las muestras de saliva y plasma se realizó mediante la técnica de Nested PCR utilizando cebadores específicos para HHV-6 y HHV-7 que detectaron (i) el gen de la proteína mayor de la cápside de HHV-6 (72), (ii) U10, gen α de HHV-7 (73).

Para la amplificación del ADN genómico de HHV-6, en una primera reacción de PCR se usaron los cebadores EX1 secuencia 5´-GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG-3´ y EX2 5´- TGGCCGCATTCGTACAGATACACGGAGG-3´.

Para la amplificación de ADN genómico de HHV-7, en una primera reacción de PCR se usaron los cebadores HV7 5'-TATCCCAGCTGTTTTTCATATATAGTAAC-3' y HV8 5'-GCCTTGCGGTAGCACTAGATTTTTTG-3'. Para cada reacción se realizó una mezcla cuyo volumen final fue de 50µl y que contenía un buffer de PCR 10X; 400 mM dNTP; 0,2 mM de primers o cebadores; 0,6µl de MgCl₂ (50mM) y 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y 2µl de ADN obtenido de cada muestra de saliva y plasma.

Para HHV-6 la amplificación se hizo en un total de 40 ciclos, incluida la desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 1 minuto.

Para HHV-7 la amplificación consto de 40 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación 55°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 1 minuto. La cantidad de ciclos así como las temperaturas y tiempos fueron modificados del protocolo original.

Para la segunda amplificación se utilizó para HHV-6 el cebador IN3 5'-GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG-3' y un segundo cebador IN4 5'-ATCCGAAACAACGTCTGACTGGCA-3'. Para HHV-7 los cebadores usados fueron HV7N1 5'-ACCAATTCAGTTTTTCATCCAG-3' y HV8N2 5'-TTGAAGAGGAGAATTCTGTAC-3'. Para cada reacción se realizó una mezcla cuyo volumen final fue de 50µl y que contenía un buffer de PCR 10X; 200mM dNTP; 0,2 mM de primers o cebadores; 0,6µl de MgCl₂ (50mM) y 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y 1µl del producto.

Para HHV-6 la amplificación se hizo en un total de 40 ciclos que incluyeron la desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 1 minuto y la extensión a 72°C por 2 minutos.

Para HHV-7 la amplificación constó de 40 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 55°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 1 minuto. La cantidad de ciclos así como las temperaturas y tiempos fueron modificados del protocolo original.

En cada reacción se procesaron en paralelo como controles positivos, ADN genómico obtenido de HHV-6B Z29 y HHV-7 SB provistos por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta USA (CDC), como controles negativos, agua tridestilada y un marcador de peso molecular de Invitrogen, que permitió reconocer las bandas esperadas. Después del ciclado la reacción fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y los productos específicos fueron visualizados en un transiluminador de luz UV. Para HHV-6 las bandas esperadas fueron de 521 pares de bases y 267 pares de bases para la primera y segunda reacción respectivamente (Figura 6).

Para HHV-7 las bandas esperadas fueron de 186 pares de bases y 110 pares de bases para la primera y segunda reacción respectivamente.

2.2.3 Tipificación de las especies de HHV-6 en muestras de plasma.

La detección del ADN viral correspondiente a las especies A y B de HHV-6 en las muestras de plasma se realizaron mediante la técnica de PCR.

Se utilizaron cebadores específicos que identificaron el gen que codifica la proteína mayor del tegumento (74).

2.2.3. A Tipificación de HHV6 A en muestras de plasma. Técnica PCR

Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, el cual contenía 36,9 µl de agua bidestilada; 5 µl de buffer 10X; 3 µl de Cl₂Mg (50 mM); 0,6 µl de dNTP (10 µM de cada deoxinucleótido); 0,5 µl de cebador O15 (33 µM), secuencia: 5'-CGGTGTCACACAGCATGAACTCTC-3'; 0,5 µl de cebador O16 (33 µM), secuencia: 5'-ACTCGGAATGAGGTCAACTTCT-3'; 0,5 µl de *Taq* polimerasa (5 U/ µl) y 3 µl de ADN disuelto en agua.

La reacción se realizó en tubos de 0,5 ml de capacidad y fue ciclado en termociclador según el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 1 minuto a 94 °C, 37 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, alineación de 1 minuto a 60 °C y extensión de 1 minuto a 72 °C, y finalmente una extensión de 5 minutos a 72 °C.

Después del ciclado la reacción fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y el producto específico de 631 pares de bases, fue visualizado en un transiluminador de luz UV (74).

2.2.3. B Tipificación de HHV6 B en muestras de plasma. Técnica PCR

Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μ l, el cual contenía 36,9 μ l de agua bidestilada; 5 μ l de buffer 10X; 3 μ l de Cl_2Mg (50 mM); 0,6 μ l de dNTP (10 μ M de cada deoxinucleótido); 0,5 μ l de cebador O10 (33 μ M), secuencia: 5'-GATCCGACGCCTACAAACAC-3'; 0,5 μ l de cebador O17 (33 μ M), secuencia: 5'-GCAAAACCAAGAATTGTCCAG-3'; 0,5 μ l de *Taq* polimerasa (5 U/ μ l) y 3 μ l de ADN disuelto en agua.

La reacción se realizó en tubos de 0,5 ml de capacidad y fue ciclado en termociclador según el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial de 1 minuto a 94 °C, 37 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, una alineación de 1 minuto a 63 °C y una extensión de 1 minuto a 72 °C, y finalmente una extensión de 5 minutos a 72 °C. Después del ciclado la reacción fue corrida electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y el producto específico de 727 pares de bases, fue visualizado en un transiluminador de luz UV (74).

En ambos casos el protocolo original fue modificado.

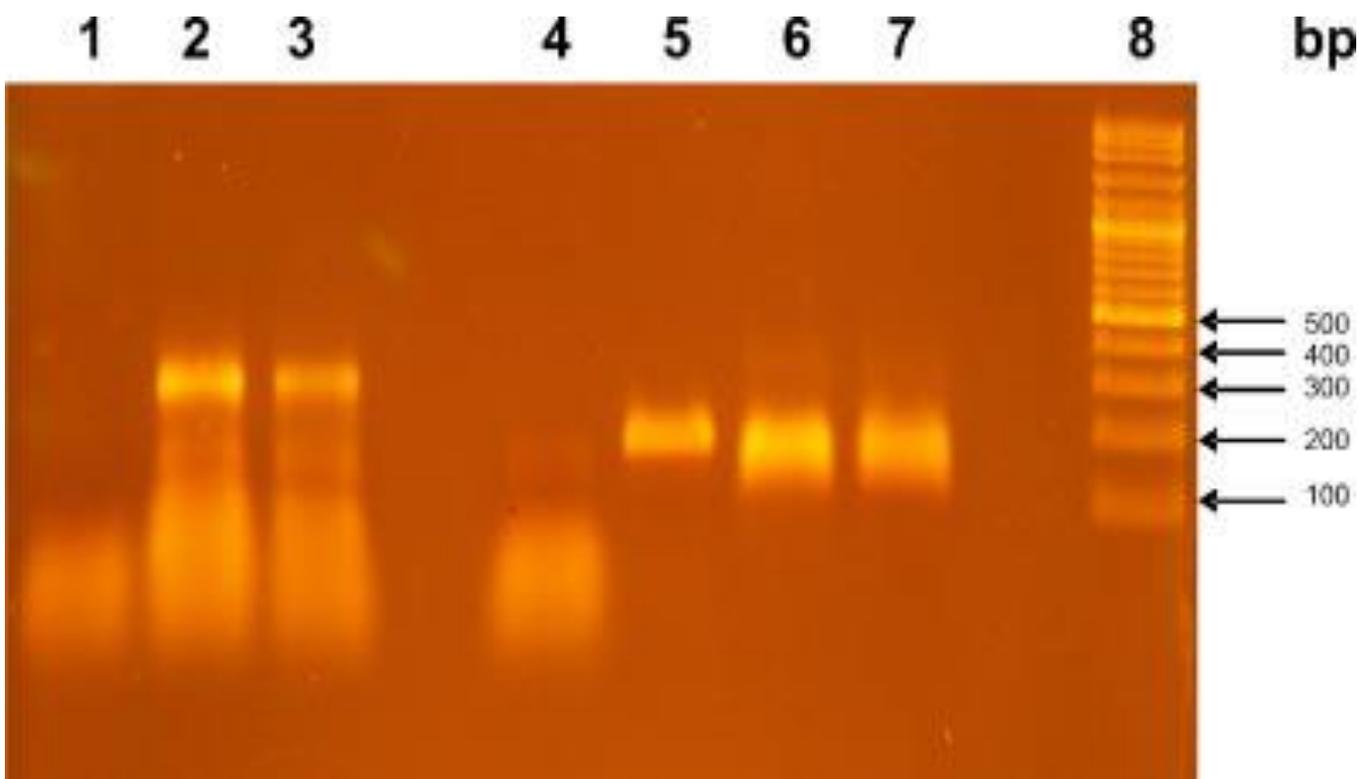


Figura 6. Nested PCR para la detección de ADN de HHV-6 y HHV-7. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Calle1: Control negativo de HHV-6, Calle 2: control positivo de HHV-6; Calle 3: amplificado de HHV-6 en muestra de saliva; Calle4: control negativo de HHV-7; Calle 5: control positivo de HHV-7; Calle6: amplificado de HHV-7 de muestra de saliva; Calle7 amplificado de HHV-7 en muestra de plasma; Calle 8: marcador de peso moléculas de 100pb.

2.3 DETECCIÓN Y TITULACIÓN DE IGG ESPECÍFICA Y DETERMINACIÓN DE PERFILES DE ISOTIPOS DE IGG ESPECÍFICA PARA HHV-6 Y HHV-7 (IGG1, IGG2, IGG3 e IGG4)

2.3.1 Estandarización técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de Anticuerpos tipo IgG anti HHV-6 y anti HHV-7

Cinética de expresión de antígenos de HHV-6 y HHV-7 en las líneas celulares Molt-3 y Supt1

Se realizó una curva de expresión de antígenos con el objetivo de determinar el momento en que se produce la mayor expresión de antígenos de HHV-6 y HHV-7 en las líneas celulares Molt3 y Supt1 respectivamente.

Los niveles de expresión de antígenos se estudiaron semicuantitativamente mediante IFI.

❖ Línea celular: se utilizaron las líneas celulares linfoblastoide Molt-3 (Figura 7) y SupT1 para HHV-6 y HHV-7 respectivamente, infectadas con HHV-6 variante B cepa Z29 y HHV-7 cepa SB, a partir de inóculos provistos por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta USA (CDC). Se realizó un cocultivo con células infectadas y no infectadas, el cultivo no infectado fue mantenido como control.

Como medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2% de glutamina y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina).

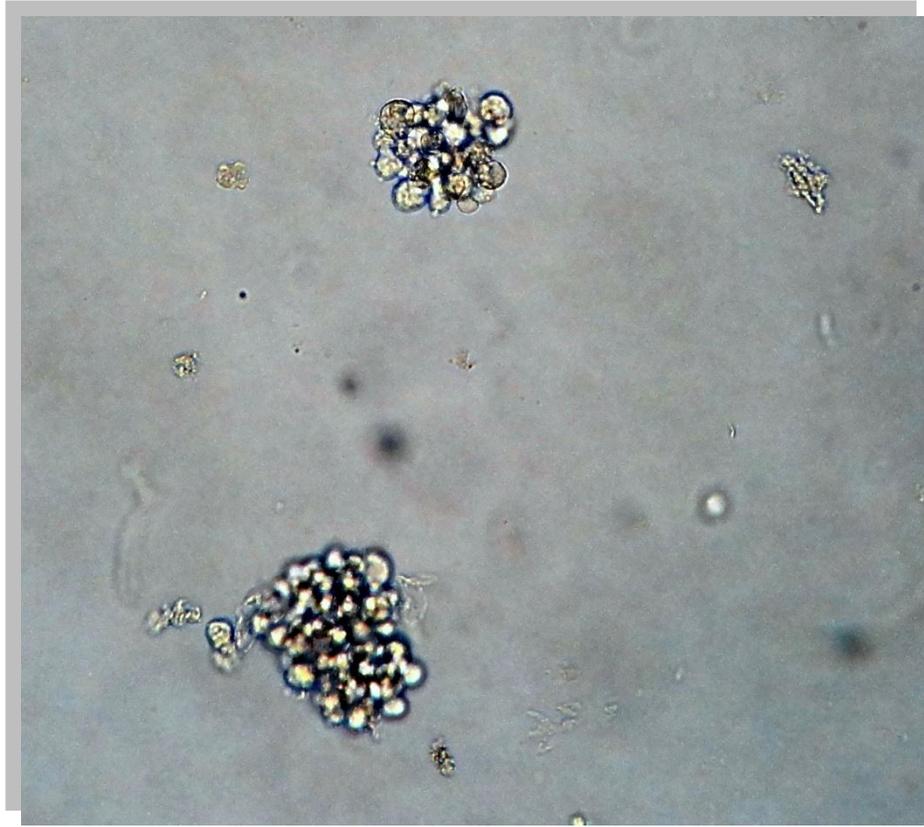


Figura 7. Cultivo células linfoblastoide Molt 3. No infectadas

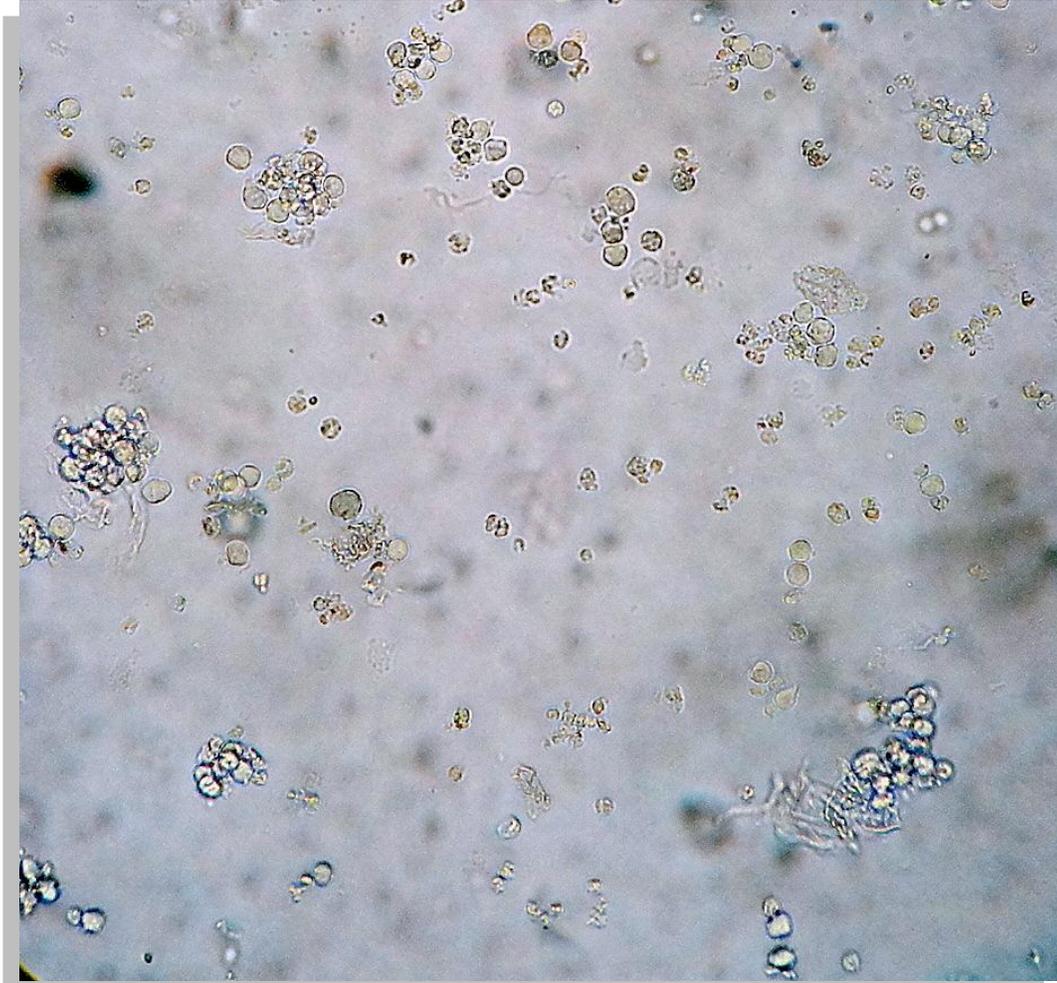


Figura 8. Cultivo células linfoblastoide Molt 3. Se observa el efecto citopático que evidencia la infección.

❖ Preparación de improntas: sobre portaobjetos para IFI de 12 pocillos se sembraron, en paralelo, entre 5000 y 10000 células por pocillo no infectadas e infectadas con HHV-6 y HHV 7 a partir de los cultivos Molt3 y Supt1 desde el día 2 al día 10 posinfección (PI) para HHV-6 y desde el día 2 al día 14 PI para HHV-7. Las improntas fueron luego fijadas en acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente y conservadas a -20°C hasta su utilización.

❖ Sueros controles: se utilizaron sueros de referencia positivos y negativos, cedidos por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta, USA (CDC).

Los sueros fueron ensayados a partir de la dilución 1/20 de acuerdo al inserto. En esta dilución los sueros controles positivos usados, dieron positivos para HHV-6 y HHV-7 respectivamente y negativos para el otro género viral y los sueros controles negativos resultaron no reactivos para HHV-6 y HHV-7.

Se utilizaron, el anticuerpo monoclonal C31108-103 de ratón que reconoce la proteína viral de HHV-6 de 101kDa específica y el 5E1 que reconoce la pp85 de HHV-7, en una dilución de 1/100 como parte de la técnica de IFI.

❖ Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): sobre las improntas realizadas a partir de cultivos de células no infectadas, se incubaron los sueros controles positivos y negativos en una dilución 1/20. Estas improntas fueron utilizadas como control negativo de la infección.

Sobre las improntas realizadas a partir de células infectadas con HHV-6 y HHV-7 se incubaron los sueros positivos de referencia en diluciones entre 1/20 y 1/320.

Luego de la incubación con los sueros a 37°C durante 30 minutos, las improntas fueron lavadas dos veces durante 5 minutos en solución salina tamponada (PBS) y secadas a temperatura ambiente.

Posteriormente los preparados fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con una dilución de 1/100 de anti IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína y conteniendo Azul de Evans como coloración de contraste en una dilución final de 1/20000.

Se lavaron 2 veces con PBS, se secaron y montaron para poder ser observadas en microscopio de epifluorescencia.

Utilizando el aumento de 40X, se contaron la cantidad de células fluorescentes presentes en 3 campos por pocillo, se promediaron los tres valores y se calculó el porcentaje de infección para cada día.

Curva de Expresión de Antígenos para HHV-6 y HHV-7

❖ Curva de expresión de antígenos para HHV-6 en cultivo celular Molt3

Las células infectadas expresaron antígenos virales a partir del día 6 PI evidenciado por la observación de fluorescencia. Aunque la impronta correspondiente al día 7 de cultivo fue la que presentó mayor porcentaje de células infectadas (47%), se consideró óptimo el día 8 PI por permitir observar células fluorescentes con la dilución más alta obtenida, 1/160 con el suero de referencia positivo, indicando así el día óptimo para la realización de las imprints (indicado en negrita en la tabla 2). Los controles positivos y negativos y el anticuerpo monoclonal sembrados en células no infectadas, así como el control negativo sembrado en células infectadas no tuvieron fluorescencia (tabla 2).

Tabla 2 Cinética de expresión de antígenos y porcentaje de células Molt-3 infectadas con HHV-6

| Días pos infección | Título de IgG anti HHV-6 | Porcentaje de infección |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| 2-5 | Negativo | 0% |
| 6 | 1/40 | 27% |
| 7 | 1/80 | 47% |
| 8 | 1/160 | 34% |
| 9 | 1/80 | 32% |
| 10 | 1/80 | 12% |

❖ Curva de expresión de antígenos para HHV-7 en cultivo celular Supt1

Las células infectadas expresaron antígenos virales a partir del día 8 PI evidenciado por la observación de fluorescencia. Aunque la impronta correspondiente al día 10 de cultivo fue la que presentó el mayor porcentaje de células infectadas (56%) con un título de 1/80, se consideró óptimo el día 12 PI. Si bien el porcentaje de células infectadas fue menor (51%), se pudo lograr la observación con la mayor dilución de suero, 1/160 indicando así el día óptimo para la realización de las improntas (indicado en negrita en la tabla 3). Los controles positivos y negativos y el anticuerpo monoclonal sembrados en células no infectadas, así como el control negativo sembrado en células infectadas no tuvieron fluorescencia (tabla 3).

Tabla 3. Cinética de expresión de antígenos y porcentaje de células Supt-1 infectadas con HHV-7

| Días pos infección | Título de IgG anti HHV-7 | Porcentaje de infección |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| 2-6 | Negativo | 0% |
| 7 | 1/20 | 30% |
| 8 | 1/40 | 50% |
| 10 | 1/80 | 56% |
| 12 | 1/160 | 51% |
| 13 | 1/80 | 45% |
| 14 | 1/80 | 32% |

Prueba de Especificidad de la técnica de Inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos tipo IgG anti HHV-6 y HHV-7

A fin de determinar el cruce antigénico entre los miembros del género Roseolovirus se utilizaron improntas de células Molt-3 infectadas con HHV-6 variante B cepa Z29 obtenidas al día 8 post infección e improntas de células SupT1 infectadas con HHV-7 cepa SB obtenidas al día 12 post infección.

Se pudo determinar que en la dilución 1/10 no se produce cruce antigénico entre los géneros estudiados (Tabla 4).

En base a los resultados obtenidos se consideró para el trabajo la dilución 1/20 como el punto de corte para definir especificidad de respuesta inmune contra HHV-6 y HHV-7.

En concordancia con datos previamente publicados no se detectó cruce antigénico significativo entre HHV-6 y HHV-7 entre sí y con otros herpesvirus humanos (resultados no mostrados) (15, 75).

Tabla 4. Especificidad de la técnica de IFI para la detección de anticuerpos IgG
anti HHV6 y anti HHV-7

| Muestras | IgG anti HHV6 | | | | | IgG anti HHV7 | | | | |
|----------|---------------|------|------|------|------|---------------|------|------|------|------|
| | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/80 |
| 1 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 3 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 5 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - |
| 7 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - |
| 10 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 11 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 12 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 13 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - |
| 14 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 15 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 16 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - |
| 17 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 18 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 19 | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| 20 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - |

2.3.2 Detección de IgG anti HHV-6 y anti HHV-7 en suero problema

Se sembraron los sueros problemas en diluciones geométricas a partir de 1/20 y los controles positivos y negativos en una dilución 1/20 en pocillos de células infectadas y células no infectadas como control de la infección.

Luego de la incubación con los sueros a 37°C durante 30 minutos las improntas fueron lavadas con PBS dos veces durante 5 minutos y secadas a temperatura ambiente.

Posteriormente los preparados fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con 10 µl de una dilución 1/100 de anti IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína y conteniendo azul de Evans como coloración de contraste en una dilución final de 1/20000.

2.3.3 Detección de isotipos de IgG anti HHV-6 y anti HHV-7 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) en suero problema

Para la detección de isotipos se sembraron los sueros problema y los controles positivos y negativos en una dilución 1/20 tanto en pocillos de células infectadas como no infectadas.

Luego de la incubación con los sueros a 37°C durante 30 minutos las improntas fueron lavadas 2 veces con PBS durante 5 minutos y secadas a temperatura ambiente.

Posteriormente las improntas fueron incubados durante 30 minutos a 37° C con anticuerpos monoclonales de ratón (Sigma Chemical Co, St Louis) en diferentes diluciones: 1/100 para IgG1 y 1/32 para IgG2, IgG3 e IgG4 según recomendaciones del fabricante.

Las improntas fueron lavadas 2 veces con PBS durante 5 minutos y secadas a temperatura ambiente.

Posteriormente fueron incubadas con un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con fluoresceína (Sigma Chemical Co, St Louis) en una dilución de 1/100 para revelar la reacción y conteniendo azul de Evans como coloración de contraste en una dilución final de 1/20000.

2.3.4 Interpretación de la IFI

La observación de las improntas se realizó en un microscopio Olympus IX50 con accesorios de epifluorescencia halógena (Olympus TH3), filtro azul banda angosta Ph2, en objetivo plano acromático 60x.

Una dilución de suero se consideró positiva cuando el 20-30% de la población celular de la impronta presentó una fina tinción granular, usualmente en una célula entera (Figura 9).

Las células negativas presentaron una tinción rojiza no fluorescente debido a la coloración de contraste.

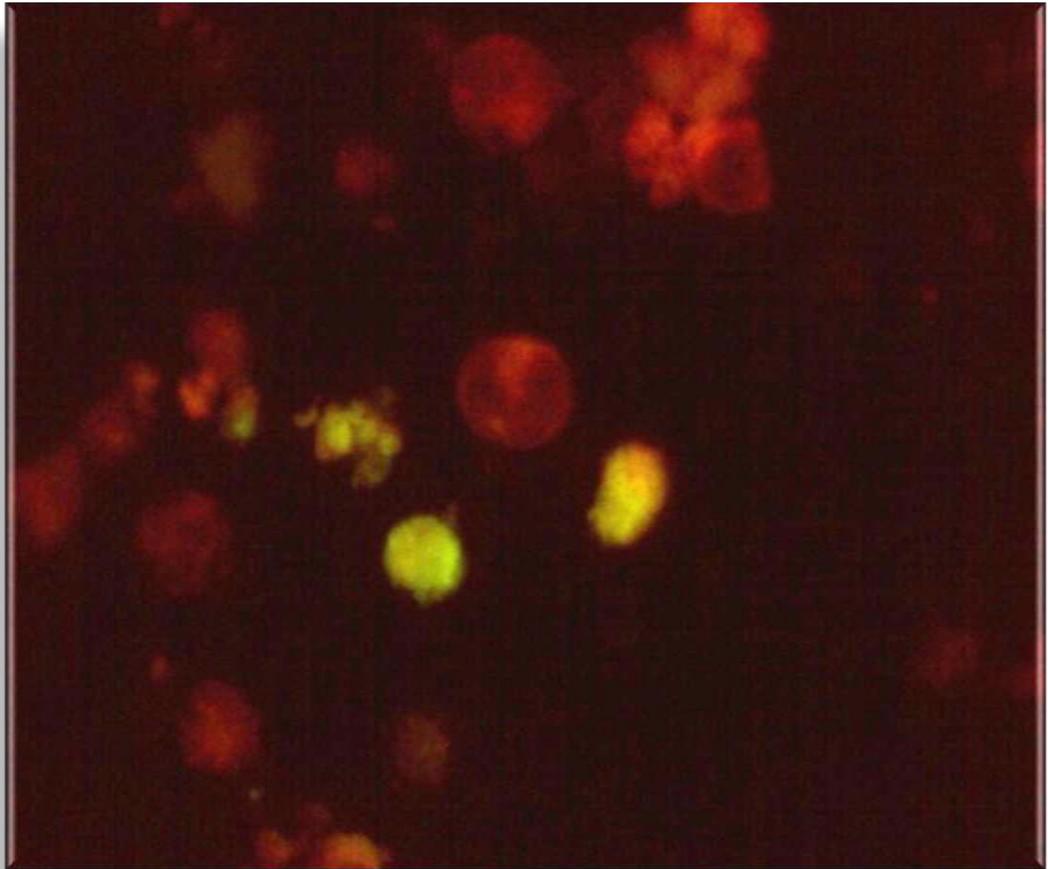


Figura 9. Reacción de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-HHV-6. La imagen muestra una reacción positiva.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable título de anticuerpos correspondió a la máxima dilución del suero en que aún la inmunofluorescencia era positiva y fue transformada en logaritmo de base 2 (\log_2).

Los valores de tendencia central se expresan como media geométrica del título de anticuerpos (MGT) que corresponde a los valores medios del título de anticuerpos transformado en antilogaritmo de base 2 (antilog_2).

La variable título de anticuerpos luego de transformada en \log_2 fue analizada utilizando la Prueba K-S (Kolmogorov-Smirnov) para comprobar si la distribución de las frecuencias era normal. Como la distribución de la variable considerada, en contraste con la normal, fue diferente, $p= 0.004$ (Z de Kolmogorov-Smirnov), las inferencias fueron realizadas mediante pruebas no paramétricas. Se calcularon los Intervalos de Confianza del 95% (IC95%), por métodos de simulación con remuestreo (bootstraps $n=1000$). Para la inferencia basada entre dos muestras se utilizó el test de Wilcoxon (Mann-Whitney (U)). Para la inferencia basada en múltiples muestras se utilizó el test de Kruskal Wallis.

Con las variables categorizadas se hicieron tablas de contingencia y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman, Test χ^2 , Prueba exacta de Fisher.

El intervalo de confianza de la proporción fue calculado por el método de Wilson para pequeñas muestras (95% de Intervalo de Confianza).

Se utilizó el análisis de correspondencias múltiples en donde tablas de contingencia multidimensionales fueron analizadas por el estadístico χ^2 de Pearson para inferir la dependencia o independencia de dichas variables, luego representadas en un punto en el espacio de tal forma que las relaciones de cercanía/lejanía entre los puntos calculados reflejaron las relaciones de dependencia y semejanzas existentes entre ellas. Fue calculada la inercia total.

Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Los datos fueron analizados estadísticamente por el programa InfoStat 2013p.

2.5 APROBACIÓN DEL PROYECTO y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este proyecto y el consentimiento informado, contaron con la aprobación de CIEIS Polo Hospitalario Hospital de Niños Córdoba (se anexa a continuación). En breve, durante el desarrollo del proyecto se respetaron las normas de bioética acordes a World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects 59th WMA General Assembly, Seoul, October 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/> y las normas de International Ethical Guidelines for Epidemiological Studies Prepared by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) in collaboration with the World Health Organization (WHO) CIOMS Geneva February 2008. http://www.cioms.ch/publications/layout_guide2002.pdf

Consentimiento Informado



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Médicas
Instituto de Virología
Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas

Consentimiento informado para el Proyecto:

ANÁLISIS DE LA PERSISTENCIA VIRAL EN MODELOS DE COINFECCIÓN POR VIRUS LINFOTRÓPICOS HUMANOS

Prof. Dr Jorge V Pavan

Este es un trabajo realizado por:

El Instituto de Virología y la Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los profesionales responsables somos: el Dr Leonardo Ferreyra, la Méd. Patricia Biganzoli y director es el Dr Jorge V Pavan

Estamos investigando a un grupo de los adultos sanos de la Ciudad de Córdoba a fin de conocer sus defensas contra dos microorganismos que son virus: el virus herpes 6 y el virus herpes 7 humano. Según los estudios realizados en otros países, es muy frecuente encontrar estos microorganismos en los individuos sanos. En Argentina no hay datos al respecto.

Como no han sido estudiados en nuestro país su participación nos permitirá obtener un conocimiento local de estos microorganismos. Y en términos generales también podría ayudarnos a comprender los mecanismos por los cuales los seres humanos nos defendemos de ciertas infecciones.

Su participación consiste en brindarnos una muestra de su sangre y una muestra de su saliva, durante un año en cuatro oportunidades: una vez cada tres meses. En estas oportunidades extraeremos sangre de su brazo usando una aguja y jeringa, lo que puede ocasionarle molestias. Además le pediremos que salive dentro de un tubo para obtener un poco de su saliva. Tanto la sangre como la saliva serán utilizadas para la detección de estos dos microorganismos así como de sus defensas contra ellos.

Su nombre y datos personales no figurarán en ninguna publicación. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y, nadie sino los investigadores tendrá acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá número en vez de su nombre. Solo

ESTA HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE

... FOUOS, HA SIDO ?RvAD PB 211-

PLCHOSdALRD eL s. No.

Dr. JULIO C. ORELLANA
Médico
M. N. 13922
PEDIATRA - ALERGISTA
C. E. 3880 C. E. 5087

137053 4 7
Q.OMEZ. YctM.e

Consentimiento Informado

los investigadores sabrán cual es su número y se mantendrá la información encerrada en cabina con llave.

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se lo informaremos si Ud así lo requiere.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. No tiene que decidir hoy si participar o no en esta investigación. Antes de decidirse, puede hablar con alguien con quien se sienta cómodo sobre la investigación. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba en esta institución y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aún cuando haya aceptado antes.

Su decisión final es voluntaria, no implica remuneración de ningún tipo y se basa en la comprensión de la información aquí contenida.

Deberá leer, firmar y fechar este consentimiento informado una vez que haya comprendido el estudio.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en manera alguna.

Nombre del Participante _____

Firma del Participante _____

Fecha _____

Día/mes/año

ESTA HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO...
.....FOLIOS H+ VV) I.PROF A)3°- P., !0
POLO i<OSPIIAI.AKIÚ EL _____

Dr. JULIO C. ORELLANA
MÉDICO - M.P. 33922
DE LA - ALERGIST/
C.E. 5087



C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto
Polo Hospitalario

Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto
Polo Hospitalario

GOBIERNO DE CÓRDOBA
MINISTERIO DE SALUD

INFORME DE EVALUACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|-----------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|------------------------|----------------------|--|
| Titulo del Trabajo de Investigación presentado | "Análisis de la persistencia viral en modelos de coinfección por virus linfotrópicos humanos" | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre Abreviado | ----- Número ----- | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre de la Droga en estudio | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre del Investigador principal | Dr. Pavan, Jorge Victoria | | | | | | | | | | | | | | |
| Nombre de la Institución y Sede de la Investigación | Instituto de Virología -Facultad de Ciencias Médicas -U.N.C. | | | | | | | | | | | | | | |
| Fecha de Presentación | 08 de marzo de 2012 | | | | | | | | | | | | | | |
| Documentos Presentados | <ol style="list-style-type: none">1) Nota dirigida al Coordinador del C.I.E.I.S. solicitando la evaluación del protocolo.2) Formulario de inscripción al Registro Provincial de investigaciones en Salud (Formulario REPIS para Investigaciones No Patrocinadas): Impreso en formulario actualizado, firmado por el investigador (2 copias),3) Protocolo de Investigación: 3 copias en idioma español4) Formulario de Consentimiento Informado y Hoja de Información al paciente que se utilizará: 3 Copias identificadas para la firma del Comité5) Resumen del Protocolo de Investigación y Formulario de Consentimiento Informado: 12 copias agrupadas para repartir entre los integrantes del Comité6) Fotocopia del Formulario de Inscripción del Investigador o investigadores principales, ante el Re.P.I.S. (actualizado, firmado y fechado)7) C.V. abreviado del Investigador Principal8) Una copia de la declaración del acuerdo del/los investigador/es para cumplir con los principios éticos propuestos en los documentos y guías pertinentes y relevantes y de haber informado debidamente a todo el equipo que interviene de las mismas..9) Declaración de la proyección prevista y del origen institucional de los pacientes que serán reclutados.- | | | | | | | | | | | | | | |
| Integrantes del CIEIS | <table><tr><td>Ermelinda Bungur</td><td>Mirta Beatriz Miras</td></tr><tr><td>Hugo Cambursano</td><td>Liliana Beatriz Ramos</td></tr><tr><td>Daniel Ornar David</td><td>Jesús Luis Vega</td></tr><tr><td>Silvia Estela Mengarelli</td><td>Hugo Oscar Vilarrodona</td></tr><tr><td>Carla Gabriela Asteggiano</td><td>Julio Cesar Orellana</td></tr><tr><td>Ana Maria Littvik</td><td>Mónica Beatriz Heredia</td></tr><tr><td>Alberto Mario Masuet</td><td></td></tr></table> | Ermelinda Bungur | Mirta Beatriz Miras | Hugo Cambursano | Liliana Beatriz Ramos | Daniel Ornar David | Jesús Luis Vega | Silvia Estela Mengarelli | Hugo Oscar Vilarrodona | Carla Gabriela Asteggiano | Julio Cesar Orellana | Ana Maria Littvik | Mónica Beatriz Heredia | Alberto Mario Masuet | |
| Ermelinda Bungur | Mirta Beatriz Miras | | | | | | | | | | | | | | |
| Hugo Cambursano | Liliana Beatriz Ramos | | | | | | | | | | | | | | |
| Daniel Ornar David | Jesús Luis Vega | | | | | | | | | | | | | | |
| Silvia Estela Mengarelli | Hugo Oscar Vilarrodona | | | | | | | | | | | | | | |
| Carla Gabriela Asteggiano | Julio Cesar Orellana | | | | | | | | | | | | | | |
| Ana Maria Littvik | Mónica Beatriz Heredia | | | | | | | | | | | | | | |
| Alberto Mario Masuet | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resolución del CIEIS | APROBADO | | | | | | | | | | | | | | |
| Fecha de Aprobación | 16 de Abril de 2012 | | | | | | | | | | | | | | |

Secretaría C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto -
Polo Hospitalario
Hospital de Niños de la Santísima Trinidad. Bajada Pucará SIN,
Córdoba 5000, Argentina
TEFAX: 0351-4584331 / 4586400
INT.601



**C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto
Polo Hospitalario**

Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto Polo Hospitalario

GOBIERNO DE CÓRDOBA
MINISTERIO DE SALUD

| | |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Documentos Aprobados y Fecha de Aprobación | <ul style="list-style-type: none"> ■ Protocolo de Investigación: "Análisis de la persistencia viral en modelos de coinfección por virus linfotrópicos humanos" ■ Formulario de Consentimiento Informado y Hoja de Información al paciente |
| Observaciones y Sugerencias | Sin Observaciones y Sugerencias |
| Modificaciones de Cumplimiento Obligatorio | Sin Modificaciones de Cumplimiento Obligatorio |

(CIEIS -Versión 03/2008)

En el caso de una decisión positiva el investigador deberá:

- Cuando corresponda, presentar copia de la aprobación del ANMAT
- Comunicación de inicio de la investigación (reclutamiento del 1º paciente)
- Entregar los reportes de avances cada 12 meses (progreso del protocolo con los pacientes reclutados y datos parciales si los hubiese)
- Notificar al CIEIS en caso de enmiendas al protocolo, o al material de reclutamiento o de la información para los potenciales participantes en la investigación o al formato del Consentimiento Informado.
- Entregar copias de los Reportes de Seguridad que se reciban.
- Reportar Eventos Adversos Serios e inesperados relacionados con la conducción del estudio.
- Informar de la terminación del estudio o circunstancias no esperadas o decisiones significativas tomadas por otros CIEIS

Fecha: Córdoba, 23 de Abril de 2012


 DR. JULIO C. ORELLANA
 MEDICO - M.P. 13922
 PEDIATRA - ALERGISTA
 C.E. 3880 C.E. 5087
 Firma Miembro del C.I.E.I.S.


 Firma Miembro del C.I.E.I.S.
 Dr. DANIEL O. DAVID
 SUB-COORDINADOR C.I.E.I.S.
 POLO HOSPITALARIO

Secretaría C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto - Polo Hospitalario
 Hospital de Niños de la Santísima Trinidad Bajada Pucará SIN, Córdoba 5000, Argentina
 TE-FAX: 0351-4584331/4586400 INT.601

Pag. N° 2



Gobierno de Córdoba
Ministerio de Salud

REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (RePIS)

REGISTRO DE INVESTIGACIONES NO PATROCINADAS

N° DE RePIS
DE INVESTIGACIONES NO
PATROCINADAS
REGISTRADAS EN CIEIS

| I. PATROCINANTE (Universidad, Fundación, Institución que otorga beca. Corresponde marcar NO, si es independiente de autogestión) | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------|
| Posee Patrocinante: | SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| Identificación: | | | |
| Carácter: | Público <input checked="" type="checkbox"/> Privado <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> | | |
| II. TÍTULO | | | |
| Título de la Investigación | ANÁLISIS DE LA PERSISTENCIA VIRAL EN MODELOS DE COINFECCIÓN POR VIRUS LINFOTRÓPICOS HUMANOS | | |
| Especialidad Vinculada | Virología. Salud Humana | | |
| Objetivo principal | Realizar un aporte al conocimiento de modelos de coinfección humana por Herpesvirus linfotrópicos humanos. | | |
| Consentimiento Informado (Versión y Fecha) | Marzo 2012 | | |
| III. INVESTIGADOR | | | |
| Nombre Investigador Principal | Pavan Jorge Victorio | | |
| IV. EQUIPO DE INVESTIGADORES | | | |
| Nombres | Biganzoli Patricia | | |
| | Ferreya Leonardo | | |
| | | | |
| | | | |
| V. TIPO DE INVESTIGACIÓN (marcar con cruz lo que corresponda) | | | |
| Descriptivo | <input type="checkbox"/> Descriptivo simple | Observacional | <input type="checkbox"/> de Cohortes |
| | <input type="checkbox"/> Descriptivo correlacional | | <input type="checkbox"/> de Casos y Controles |
| | <input checked="" type="checkbox"/> Descriptivo longitudinal | | |
| Otros (Describir): | | | |
| VI. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO (marcar lo que corresponda, pueden ser varias marcas) | | | |
| <input type="checkbox"/> | Investigación en Genética humana | | |
| <input type="checkbox"/> | Investigación en Reproducción Humana | | |
| <input type="checkbox"/> | Estudios Farmacológicos en Fase I o II | | |
| <input type="checkbox"/> | Estudios Clínicos con Vacunas (cualquier Fase) | | |
| <input type="checkbox"/> | Investigaciones consideradas de alto riesgo | | |
| <input type="checkbox"/> | Nuevos procedimientos aún no descriptos y/o validados en la literatura (aún en Fase IV) | | |

Investigación con grupos vulnerables, (niños, embarazadas, ancianos, pacientes psiquiátricos, discapacitados, poblaciones marginales, prisioneros, etc.)

Estudios que incluyen investigación en farmacogenómica

VII. VINCULACIÓN INTERNACIONAL

Investigaciones coordinadas desde el extranjero o con participación extranjera

Estudios que incluyen envío de material biológico al extranjero

VIII. ALCANCE DEL ESTUDIO

Estudios multicéntricos Local Nacional Internacional

Otros:

IX. DURACIÓN

Duración de la Investigación (tiempo estimado desde el inicio a la terminación) **24 meses**

X. LUGAR DE REALIZACIÓN

| | | |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Establecimiento/s: | Instituto de Virología Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba | N° DE REPIS DEL CENTRO |
| Ciudad: | Córdoba | |
| Domicilio: | Ciudad Universitaria s/n | |
| Ámbito: | Público <input checked="" type="checkbox"/> Privado <input type="checkbox"/> Otros (Especificar): | |

XI. AUTORIDAD RESPONSABLE DEL ESTABLECIMIENTO

| | | |
|-------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Apellido y Nombre | Prof. Dr Jorge V Pavan | Firma y sello de la autoridad- Fecha |
| Cargo | Subdirector | <i>J. Pavan</i> 08/03/12 Prof. Dr. JORGE V. PAVAN Médico Cirujano - M.P. 10047 Doctor en Medicina y Cirugía |

XII. PÓLIZA DE SEGURO

Compañía Aseguradora: _____

Domicilio: _____

Ciudad: _____

País: _____

Fecha de vencimiento (deber tener vigencia mayor a 15 días al momento de presentar este formulario) ____/____/20__

Póliza presenta renovación automática: Si No Período de duración de cada Renovación: _____

XIII. COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE LA INVESTIGACION EN SALUD DONDE SE PRESENTO EL ESTUDIO

| | |
|-------------|------------------------------------------------------|
| Nombre | C.I.E.I.S. del Niño y del Adulto – Polo Hospitalario |
| Institución | Hospital de Niños de la Stma. Trinidad |
| Coordinador | Prof. Dr. Hugo O. Vilarrodona |

La información de este formulario tiene carácter de declaración jurada por lo que no se aceptarán inscripciones manuales ni enmiendas realizadas al mismo.

XIV. INFORME CIEIS

| | |
|----------------------------|---------------------------------------|
| Resultado Evaluación CIEIS | <input type="checkbox"/> Condicionada |
| | <input type="checkbox"/> Aprobada |
| | <input type="checkbox"/> Rechazada |

J. Pavan 08/03/12
Firma Investigador Sello Fecha

J. Pavan 08/03/12
Prof. Dr. JORGE V. PAVAN
Médico Cirujano - M.P. 10047
Doctor en Medicina y Cirugía

J. Orellana
Firma Autoridad Responsable Sello Fecha

Dr. JULIO ORELLANA
MÉDICO - M.P. 13922
PEDIATRA - ALERGISTA
C.E. 3880 C.E. 5087

16 ABR 2012

| XV. EVALUACIÓN DE LA INSTITUCION ACADÉMICA (Comité de tesis, Comité Capacitación y Docencia, otros) | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tiene Evaluación: | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No |
| Organismo evaluador | <input type="checkbox"/> Comité de tesis universitaria o Entidad deontológica (Consejo de Médicos) |
| | <input type="checkbox"/> Comité de Capacitación y docencia |
| | <input type="checkbox"/> Otros |
| XVI. EVALUACIÓN DE COEIS | |
| Se Solicita Evaluación: | <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No |
| Razón: | <input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art. 21- Ley 9694/09 (Art. 18 Res. 22/07) |
| | <input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art.22- Ley 9694/09 (Art. 19 Res. 22/07) |
| | <input type="checkbox"/> Ambos |
| XVII. INFORME CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD COEIS (cuando corresponda) | |
| Resultado Evaluación | <input type="checkbox"/> Aprobado (Fase I, Fase II, Reproducción Humana, Nuevos procedimientos no farmacológicos) |
| | <input type="checkbox"/> Aprobado con recomendación |
| | <input type="checkbox"/> Condicionada y aprobada |
| | <input type="checkbox"/> Condicionada y rechazada |
| | <input type="checkbox"/> Rechazada |
| | <input type="checkbox"/> Rechazada por no cumplir condicionamiento |

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Firma Autoridad/ Responsable

Fecha**Instrucciones para promotores/ investigadores y CIEIS:**

- El Investigador debe presentar ante el CIEIS este formulario por duplicado debidamente fechado, firmado y sellado.
- Este formulario debe ser llenado en computadora
- El CIEIS deberá informar el inicio, finalización, suspensión y/o cancelación del protocolo registrado en el informe trimestral, formato electrónico, enviado al RePIS.
- El CIEIS presentará ante el RePIS el formulario de inscripción, debidamente llenado, fechado y firmado con la resolución del CIEIS, en caso de encuadrarse dentro del Art. 21 y Art. 22 de la Ley 9694/09.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 RESULTADOS DEL MODELO TRANSVERSAL

El modelo Transversal está esquematizado en la figura 10.

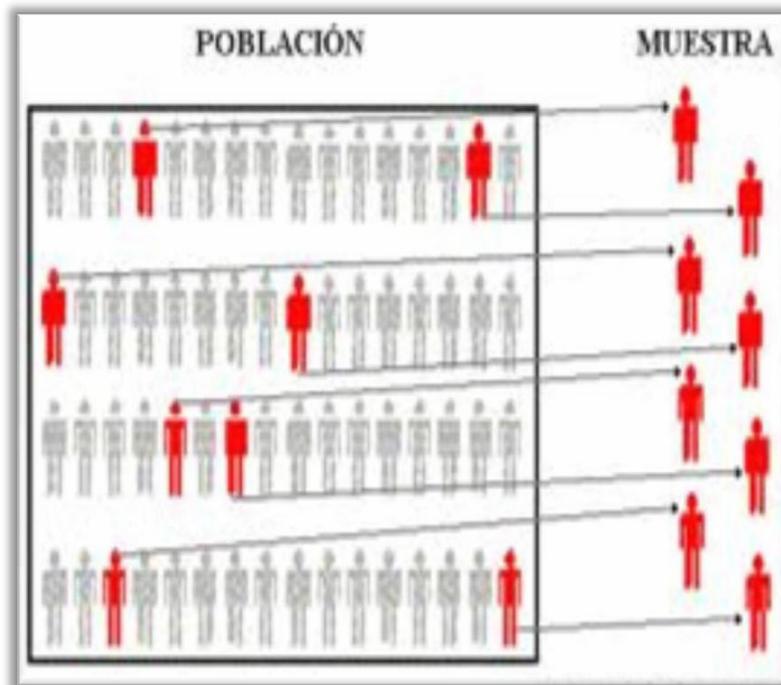


Figura 10. Diseño Experimental: Modelo Transversal

Los resultados obtenidos del estudio de la población adulta sana, la cual fue agrupada según grupo etario en grupo A, adultos y grupo B adultos mayores, se expresan utilizando tablas y figuras.

3.1.1 Detección de IgG específica anti HHV-6 y anti HHV-7 en muestras de suero.

En primer término se presentan los resultados obtenidos del estudio serológico, que consistió en un análisis cuantitativo, en el cual se determinaron los títulos de anticuerpos IgG específicos para HHV-6 y HHV-7 expresados en media geométrica del título (MGT) y como dilución transformada en \log_2 .

La MGT de anticuerpos y los intervalos de confianza del 95% (IC95%) del HHV-6 para el grupo A y para el grupo B se observan en la Tabla 5. Realizado el análisis estadístico, aplicando el test de Wilcoxon, se puede establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la MGT de anticuerpos para HHV-6 detectados en el grupo A respecto a la detectada en el grupo B ($p < 0,59$).

Tabla 5. MGT de anticuerpos e IC 95% de HHV-6 para el grupo A y el grupo B

| Grupo | <i>n</i> | MGT IgG HHV-6 | IC 95% |
|--------------|-----------------|--------------------------|---------------|
| A | 40 | 104 | 79-136 |
| B | 18 | 119,4 ^a | 86,8-158,7 |

a =Wilcoxon $p=0,59$

En la Tabla 6, se observa la MGT de anticuerpos y los intervalos de confianza del 95% del HHV-7 para el grupo A y para el grupo B. Aplicando el test estadístico de Wilcoxon se puede determinar que existe diferencia estadística entre ambos grupos, con valores mayores en el grupo B con respecto al A ($p < 0,0021$).

Tabla 6. MGT de anticuerpos e IC 95% de HHV-7 para el grupo A y el grupo B

| Grupo | <i>n</i> | MGT IgG HHV-7 | IC 95% |
|--------------|-----------------|--------------------------|---------------|
| A | 40 | 79 | 62-100 |
| B | 18 | 159,8 ^a | 115,4-205,1 |

a =Wilcoxon entre categoría de edad y título IgG HHV-7 $p=0,0021$.

Con más detalle, en la figura 11, se grafican la MGT y su error estándar de los valores individuales del título de IgG expresados como \log_2 para HHV-6 y HHV-7, según los diferentes grupos estudiados.

La media del \log_2 del título de IgG para HHV-7 fue mayor para el grupo B ($p=0,0021$).

No hubo correlación entre los títulos de IgG para HHV-6 y HHV-7 dentro de cada grupo (Coeficiente de correlación de Spearman 0,22; $p=0,25$).

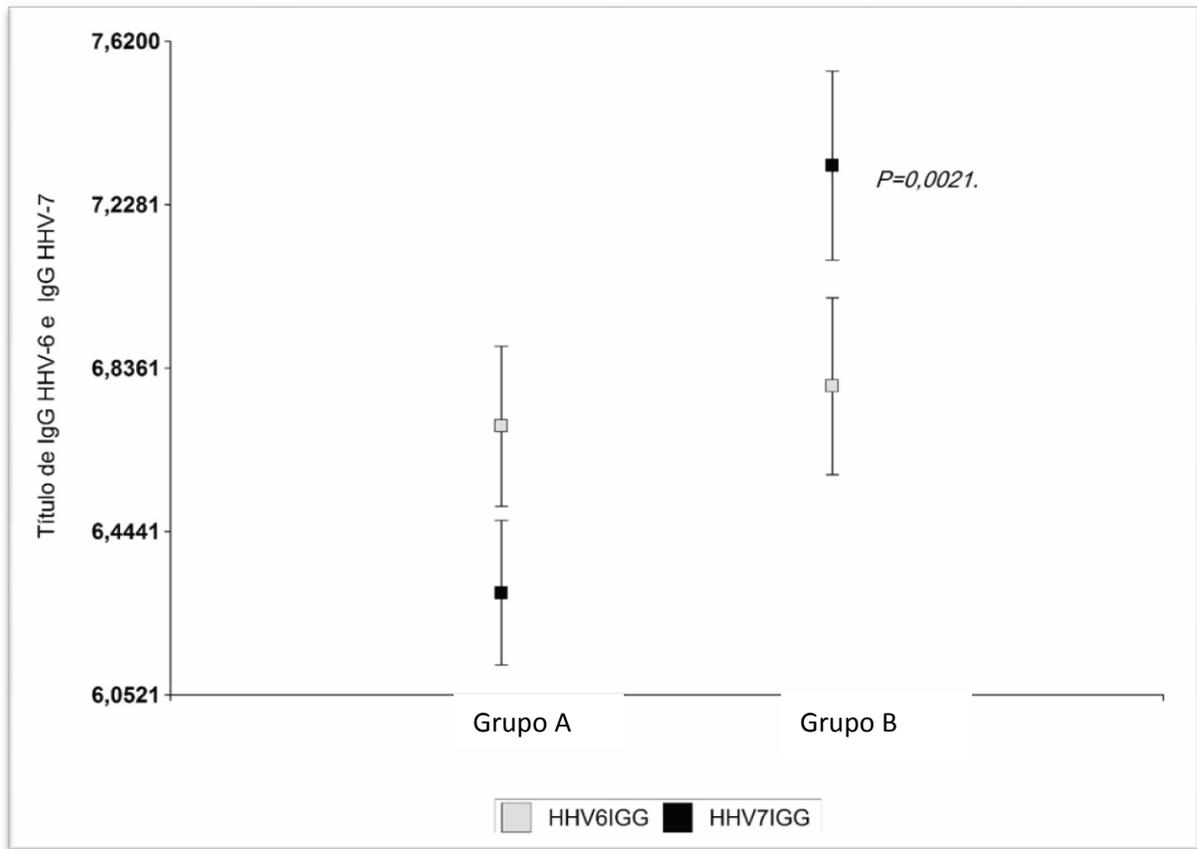


Figura 11. Medias y errores estándar de los valores individuales de los títulos de IgG expresados como \log_2 para HHV-6 y HHV-7 discriminados por grupo A y B

En el grupo A no hubo diferencias estadísticamente significativas para los títulos de anticuerpos según el sexo: MGT IgG HHV-6 sexo masculino 94,4 (IC 95% 70,5-127,1) vs sexo femenino MGT 132 (IC 95% 68,1-256) $p= 0,24$; MGT IgG HHV-7 sexo masculino 72,5 (IC 95% 54,9-96,34); sexo femenino 96,3 (IC 95% 55,3-167,7) $p=0,37$ (Test de Wilcoxon).

En el grupo B para HHV-6 y HHV-7 se observó que, de igual manera como sucede en el grupo A, no se establece una diferencia estadísticamente significativa para los títulos de anticuerpos según el sexo: MGT IgG HHV-6 sexo masculino 113 (IC 95% 73-174,8) vs sexo femenino MGT 109,14 (IC 95% 63,6-187,4) $p= 0,97$; MGT IgG HHV-7 sexo masculino 174,8 (IC 95% 107,6-282) ; sexo femenino 148 (IC 95% 84,4-259,6) $p=0,77$ (Test de Wilcoxon).

3.1.2 Caracterización del perfil de isotipos IgG específica para HHV-6 y HHV-7 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) en muestras de suero

En la Tabla 7 se observa la respuesta de isotipos de IgG para HHV-6 y HHV-7 desarrolladas en el grupo A y en el grupo B (en proporciones, intervalo de confianza del 95% de la proporción y en valores absolutos) y la estadística inferencial intragrupo e intergrupo.

Los valores estadísticamente significativos intergrupos están resaltados en negrita.

En un primer análisis intragrupo podemos observar que en el grupo A el HHV-6 tuvo un perfil de isotipos de tipo IgG1, mientras que HHV-7 el perfil de isotipo fue de IgG1 e IgG3. Se establece una diferencia estadísticamente significativa en los valores hallados (**a**= $p < 0,002$, X^2 Test Pearson).

En el grupo B, tanto HHV-6 como HHV-7 tuvieron un perfil de isotipo IgG1, IgG3 e IgG4. No se establece, entonces, diferencias estadísticas entre los valores hallados.

En un análisis intergrupo se puede observar que HHV-6, en el grupo B, desarrolló un perfil de isotipo diferente al del grupo A, IgG3 e IgG4, con significación estadística (**b y d** = $p < 0,000$, X^2 Test Pearson).

El HHV-7, presenta también un perfil de isotipo conformado por IgG3 e IgG4 que igualmente establecen diferencias estadísticas con lo presentado en el grupo A (**c** = $p < 0,006$, X^2 Test Pearson; **e** = $p < 0,001$, X^2 Test Pearson).

Tabla 7. Patrón de isotipos del Grupo A y del Grupo B (proporciones, y valores absolutos) e Intervalos de Confianza (IC) de la proporción para HHV-6 y HHV-7

| Grupo A | n | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
|----------------|----------|-------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| HHV-6 | 40 | 100%(40/40) | 0% (0/40) | 0%(0/40) | 0% (0/40) |
| IC 95% | | | | | |
| HHV-7 | 40 | 100%(40/40) | 0% (0/40) | 32,5%(13/40)^a | 0% (0/40) |
| IC 95% | | | | | |

| Grupo B | n[*] | | | | |
|----------------|----------------------|--------------|----------|---------------------------------|---------------------------------|
| HHV-6 | 17 | 100%(17/17) | 0%(0/17) | 70,6%(12/17)^b | 58,8%(10/17)^d |
| IC 95% | | | | | |
| HHV-7 | 17 | 100% (17/17) | 0%(0/17) | 58,8%(10/17)^c | 29,4% (5/17)^e |
| IC 95% | | | | | |

* Se dispuso de 17 muestras de suero en el grupo B para estas determinaciones.

Diferencias intragrupos

Grupo A, IgG3 HHV-7 vs IgG3 HHV-6 (**a**= $p < 0,002$, X^2 Test Pearson).

Diferencias intergrupos

IgG3 HHV-6 grupo A vs IgG3 HHV-6 grupo B (**b**= $p < 0,0001$ X^2 Test Pearson).

IgG3 HHV-7 grupo A vs IgG3 HHV-7 grupo B (**c** = $p < 0,006$ X^2 Test Pearson).

IgG4 HHV-6 grupo A vs IgG4 HHV-6 grupo B (**d**= $p < 0,0001$ X^2 Test Pearson).

IgG4 HHV-7 grupo A vs IgG4 HHV-7 grupo B (**e** = $p < 0,001$ X^2 Test Pearson).

3.1.3 Detección de ADN genómico de HHV-6B y HHV-7 en muestras de saliva y plasma

Aquellas muestras de saliva y plasma que resultaron positivas para HHV-6 fueron procesadas separadamente y se realizó una PCR para determinar si correspondía a la variante HHV-6 A o B.

En la Tabla 8 se observa el hallazgo de ADN de HHV-6B y HHV-7 en muestras de saliva y plasma presentes en el grupo A y en el grupo B cuyos valores se expresan en proporciones, intervalo de confianza del 95% de la proporción y en valores absolutos.

Se realizó un análisis estadístico inferencial intragrupo e intergrupo (grupo A y grupo B), para determinar las diferencias significativas entre valores hallados. Estos quedan resaltados en la tabla en negritas.

En un primer análisis intragrupo se puede observar que en el grupo A se detectó ADN viral de HHV-6 en el 15% de las muestras de saliva, no hallándose en las muestras de plasma. En contraste, el ADN de HHV-7 fue encontrado en el 100% de las muestras de saliva así como en el 90% de las muestras de plasma. Se establece diferencia estadística significativa entre ambos virus (**a** y **b**= $p < 0,0001$ X^2 Test).

En el grupo B, no se detectó ADN viral de HHV-6 en las muestras de saliva, mientras que el 72,2% de las muestras de plasma fueron positivas. El ADN viral de HHV-7 fue detectado tanto en las muestras de saliva como de plasma, en este grupo.

Se establece una diferencia estadística entre ambos virus en este grupo en relación a la presencia del ADN viral en saliva, no así en el plasma (**c**= $p < 0,0001$ X^2 Test de Pearson).

En un análisis intergrupo se puede observar que se establece una diferencia estadísticamente significativa en los valores obtenidos de ADN viral de HHV-6

en las muestras de plasma, siendo mayor en el grupo B con respecto al A ($e= p<0,0001 X^2$ Test de Pearson). El HHV-7 no establece diferencias significativas en los hallazgos si comparamos ambos grupos en estudio ($p<0,1 X^2$ Test Pearson).

Tabla 8. Detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 viral en el Grupo A y en el Grupo B (Proporciones y valores absolutos) e Intervalos de Confianza (IC95%) de la proporción

| Grupo A | <i>n</i> | Saliva | Plasma |
|----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
| HHV-6B | 40 | 15% (6/40) | 0% (0/40) |
| IC 95% | | 7-29% | |
| HHV-7 | 40 | 100% (40/40)^a | 90% (36/40)^b |
| IC 95% | | | 77-96% |

| Grupo B | <i>n</i>[*] | Saliva | <i>N</i> | Plasma |
|----------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| HHV-6B | 11 | 0% (0/11) | 18 | 72,2%(13/18)^e |
| | | | | 49-87,5% |
| HHV-7 | 11 | 90,9%(10/11)^c | 18 | 94,4% (17/18) ^d |
| IC 95% | | 62,3-98,4% | | 74,2-99% |

*Se pudo disponer de 11 muestras de saliva para estas determinaciones.

Diferencias intragrupos

Grupo A, detección de HHV-6B en saliva vs detección de HHV-7 en saliva (**a=** $p<0,0001 X^2$ Test de Pearson).

Grupo A, detección de HHV-6B en plasma vs detección de HHV-7 en plasma (**b=** $p<0,0001 X^2$ Test de Pearson).

Grupo B, detección de HHV-6B en saliva vs detección de HHV-7 en saliva (**c=** $p<0,0001 X^2$ Test de Pearson).

Grupo B, detección de HHV-6B en plasma vs detección de HHV-7 en plasma ($d= p<0,1 X^2$ Test de Pearson). En este caso no hay diferencia estadística.

Diferencia intergrupos

Detección de HHV-6B en plasma Grupo A vs Grupo B ($e= p<0,0001 X^2$ Test Pearson).

El análisis de correspondencias múltiples permitió analizar desde un punto de vista gráfico (Figura 12) las relaciones de dependencia e independencia de variables categóricas a partir de los datos obtenidos de las tablas de contingencias, de tal modo que las relaciones de cercanía/ lejanía entre los puntos calculados reflejaron las relaciones de dependencia/independencia existentes entre ellas. Las variables categóricas seleccionadas correspondieron a las que tuvieron un p significativo en el X^2 Test de Pearson.

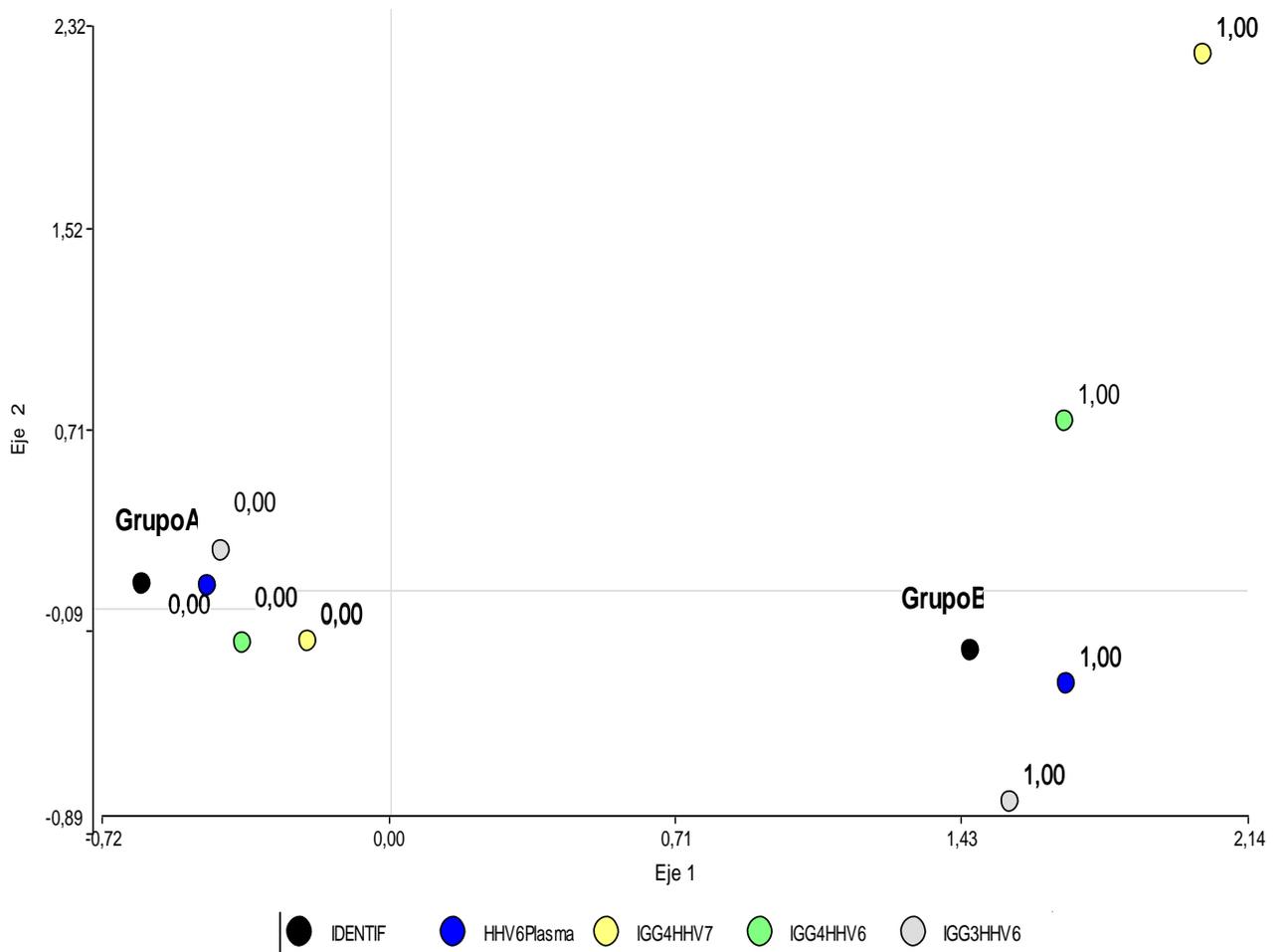


Figura 12. Análisis de correspondencias múltiples que permitió establecer relaciones de dependencia/independencia en base a la posición de las variables categóricas consideradas en el gráfico.

Se discriminó en base a los grupos definidos a “priori” (grupo A y grupo B) las variables seleccionadas IgG3, IgG4 de HHV-6 y ADN de HHV-6B en plasma e IgG4 de HHV-7. De este modo se representaron gráficamente las relaciones de cercanía/lejanía, dependencia/independencia entre las variables en un espacio donde las diferencias entre los grupos sean máximas. El gráfico sugirió en su primer eje (inercia del 65,7%) la cercanía del grupo B con los valores positivos (graficados como valor 1) detección de IgG3, IgG4 para HHV-6, detección de ADN de HHV-6B e IgG4 de HHV-7. Por otra parte el grupo A en el gráfico mantuvo su cercanía a los valores negativos (graficados como valor 0) de las citadas variables categóricas.

Resultados del modelo Longitudinal

El modelo Longitudinal está esquematizado en la figura 13.

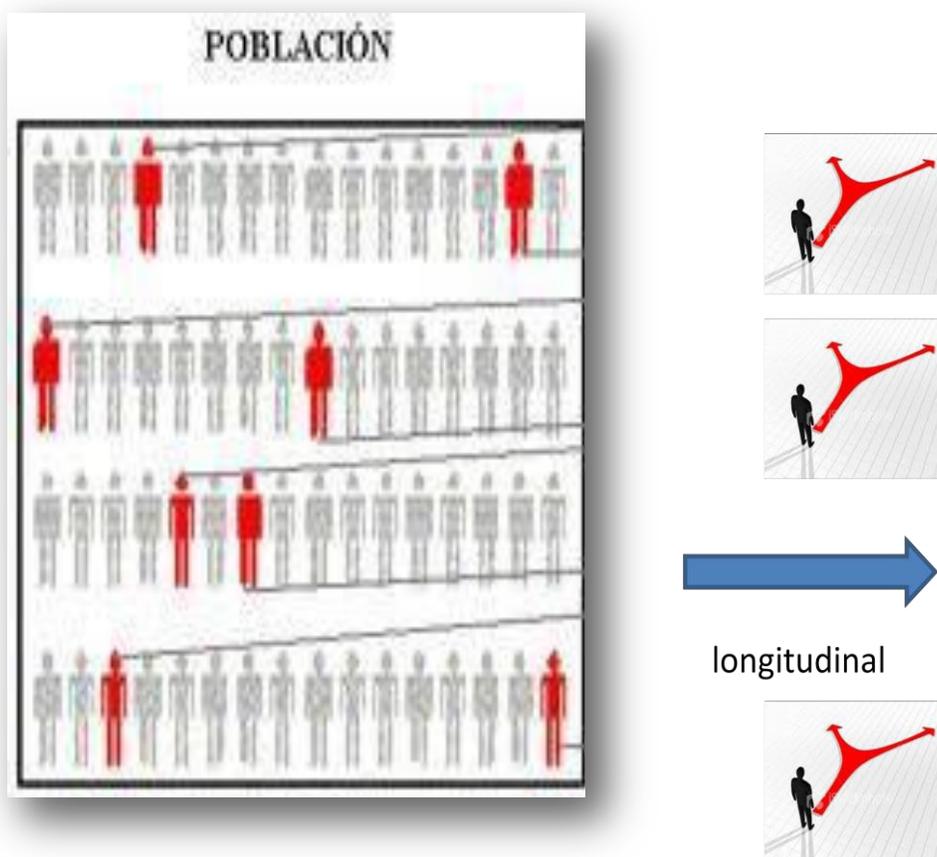


Figura 13. Diseño Experimental: Modelo Longitudinal

Los resultados obtenidos del seguimiento de 10 individuos sanos durante 18 meses, a quienes se les obtuvo muestras de saliva, plasma y suero, se expresan en tablas.

3.2.1 Caracterización del perfil de isotipos de IgG específica (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) para HHV-6 y HHV-7 en muestras de suero

En las muestras de suero se realizó la determinación del perfil de isotipos IgG específica para cada virus. En la Tabla 9, se observa la respuesta de isotipos de IgG para HHV-6 y HHV-7 desarrollada en los individuos estudiados, la que se expresa en proporciones, intervalos de confianza de la proporción y valores absolutos.

En la última columna se expresa la proporción de los individuos con seroconversión, ocurrida durante los 18 meses del seguimiento.

Ambos virus generan un perfil de isotipos IgG1 en el 100% de los individuos estudiados y en diferente proporción, perfiles de isotipos IgG3 e IgG4 sin que se establezcan entre ellos diferencias estadísticamente significativas. De igual modo el 30% de los individuos estudiados desarrollaron seroconversión para HHV-6 y un 10% lo hizo para HHV-7 durante los 18 meses del seguimiento.

Tabla 9. Patrón de isotipos (proporciones y valores absolutos e IC 95%). Frecuencia de individuos con seroconversión

| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | Seroconversión |
|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| HHV-6 | 100% (10/10) | 0% (0/10) | 40% (4/10) | 50% (5/10) | 30% (3/10) |
| IC95% | | | 17-69% | 24-76% | 11-60% |
| HHV-7 | 100% (10/10) | 10% (1/10) | 80% (8/10) | 10% (1/10) | 10% (1/10) |
| IC95% | | 1,8-40,4% | 49-94% | 1,8-40,4% | 1,8-40% |

3.2.2 Detección de ADN viral de HHV-6B y HHV-7 en muestras de saliva y plasma

En las muestras de saliva y plasma se realizó la detección de ADN genómico viral de HHV-6B y HHV-7. En la Tabla 10 se muestran los resultados, en proporciones, valores absolutos e intervalos de confianza, de la detección de ADN de HHV-6B y HHV-7 en las muestras de saliva y plasma durante el seguimiento.

Se detectó la presencia de ADN viral de HHV-7 en el 100% de las muestras de saliva procesadas y en el 100% de las muestras de plasma, mientras que ADN de HHV-6B se encontró en el 20% y 10% de las muestras respectivamente, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos (a,b = $p < 0,0001x^2$ test).

Tabla 10. Detección de ADN de HHV-6 y HHV-7 viral (proporciones y valores absolutos) e Intervalos de Confianza (IC) de la proporción

| | ADN en Saliva | ADN en Plasma |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|
| HHV-6B | 20% (2/10) | 10% (1/10) |
| IC95% | 6-51% | 1,8-40,4% |
| HHV-7 | 100% (10/10)^a | 100% (10/10)^b |

a, b = $p < 0,0001 X^2$ test

Los resultados muestran la actividad de ambos virus en la población sana, ocurrida durante 18 meses de seguimiento, caracterizada por seroconversión, variaciones en los perfiles de isotipos, presencia de ADN viral tanto en saliva como en plasma.

Ambos virus desarrollan una actividad independiente uno del otro dentro del mismo individuo.

3.2.3 Determinaciones individuales del seguimiento

A continuación, expuestos en tablas, se muestran los resultados obtenidos para cada individuo a lo largo del seguimiento, los que corresponden a título de anticuerpo IgG específico y perfil de isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y detección de ADN genómico viral en saliva y plasma (Tabla 11).

La Tabla 11 contiene, a su vez, una tabla correspondiente a cada individuo con las determinaciones realizadas en cada muestra. Las filas corresponden: fila 1: primera muestra; fila 2: segunda muestra obtenida a los tres meses de la primera; fila 3: tercera muestra obtenida seis meses posteriores a la primera; fila 4: cuarta muestra obtenida 9 meses posteriores a la primera; fila 5: quinta muestra obtenida doce meses posteriores a la primera; fila 6: sexta muestra obtenida dieciocho meses posteriores a la primera.

Las columnas corresponden a: títulos de anticuerpos, isotipo de IgG (1, 2, 3, 4), ADN viral en saliva y ADN viral en plasma para HHV-6B y HHV-7 respectivamente. Para cada individuo se destacan las celdas que indican resultados positivos, utilizando el mismo color para cada variable, comparando la actividad de cada virus. De igual manera se colorean en violeta aquellas celdas cuyos títulos correspondan a una seroconversión.

Tabla 11. Resultados del seguimiento: Título IgG, Isotipo, ADN saliva y ADN plasma de HHV-6 y HHV-7

Tabla 11. Individuo 1

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG 4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG 1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 Plasma |
|---------|-----------|------|------|------|-------|--------------|--------------|-----------|-------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 160 | + | - | + | - | - | - | 320 | + | - | + | - | - | + |
| 2 | 160 | + | - | + | - | - | - | 320 | + | - | + | - | + | + |
| 3 | 320 | + | - | - | - | + | - | 320 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 160 | + | - | + | - | + | - | 160 | + | - | + | - | + | + |
| 5 | 320 | + | - | + | - | - | - | 320 | + | - | + | - | + | + |
| 6 | 320 | + | - | - | - | - | - | 320 | + | - | + | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 2

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 Plasma |
|---------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 80 | + | - | + | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 2 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | + | - | + | + |
| 3 | 160 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 5 | 160 | + | - | + | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 6 | 160 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 3

| Muestra | IgG HHV- 6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 6 saliva | HHV- 6 plasma | IgG HHV- 7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 7 saliva | HHV-7 Plasma |
|---------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|------------------|------|------|------|------|---------------------|-----------------|
| 1 | 160 | + | - | - | - | - | - | 40 | + | - | - | - | + | + |
| 2 | 320 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | + | - | + | + |
| 3 | 80 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | + | + |
| 4 | 320 | + | - | - | - | - | - | 40 | + | - | + | - | + | + |
| 5 | 80 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 6 | 320 | + | - | - | + | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 4

| Muestra | IgG HHV- 6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 6 saliva | HHV- 6 plasma | IgG HHV- 7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 Plasma |
|---------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|------------------|------|------|------|------|-----------------|-----------------|
| 1 | 320 | + | - | - | - | + | - | 80 | + | - | + | - | + | + |
| 2 | 320 | + | - | - | - | + | - | 320 | + | - | - | - | + | + |
| 3 | 160 | + | - | - | - | + | - | 320 | + | + | - | - | - | + |
| 4 | 160 | + | - | - | - | - | - | 320 | + | - | - | - | + | + |
| 5 | 320 | + | - | - | - | + | - | 320 | + | - | + | - | + | + |
| 6 | 160 | + | - | - | - | + | - | 320 | + | - | + | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 5

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 Plasma |
|---------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 80 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | - | - | - | + |
| 2 | 40 | + | - | - | + | - | + | 40 | + | - | - | - | + | + |
| 3 | 80 | + | - | - | + | - | - | 40 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 80 | + | - | - | - | - | - | 40 | + | - | + | - | + | + |
| 5 | 80 | + | - | - | - | - | + | 80 | + | - | + | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 6

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 plasma |
|---------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 80 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 2 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 3 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 80 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 5 | 160 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 7

| Muestra | IgG HHV- 6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 6 saliva | HHV- 6 plasma | IgG HHV- 7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 7 saliva | HHV- 7 plasma |
|---------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|
| 1 | 160 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | + | + |
| 2 | 160 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | - | + |
| 3 | 320 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | + | - | - | - |
| 4 | 320 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 5 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | + | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 8

| Muestra | IgG HHV- 6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 6 saliva | HHV- 6 plasma | IgG HHV- 7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV- 7 saliva | HHV- 7 plasma |
|---------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|------------------|------|------|------|------|---------------------|---------------------|
| 1 | 80 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | + | + |
| 2 | 80 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | + | - | - | - |
| 3 | 80 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 160 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | - |
| 5 | 80 | + | - | - | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 9

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 plasma |
|---------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 320 | + | - | + | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 2 | 320 | + | - | + | - | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |
| 3 | 320 | + | - | + | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 80 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | + | - | + | + |
| 5 | 40 | + | - | - | - | - | - | 320 | + | - | - | - | + | + |
| 6 | 160 | + | - | + | + | - | - | 320 | + | - | - | - | + | + |

Tabla 11. Individuo 10

| Muestra | IgG HHV-6 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-6 saliva | HHV-6 plasma | IgG HHV-7 | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | HHV-7 saliva | HHV-7 plasma |
|---------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|-----------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 80 | + | - | + | - | - | - | 160 | + | - | - | - | - | + |
| 2 | 320 | + | - | + | - | - | - | 160 | + | - | - | - | - | + |
| 3 | 160 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 4 | 80 | + | - | - | - | - | - | 160 | + | - | - | - | + | + |
| 5 | 160 | + | - | - | + | - | - | 80 | + | - | - | - | + | + |

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo de tesis fue contribuir a la comprensión de los modelos de persistencia viral de HHV-6 y HHV-7 y de la respuesta inmune en población sana desencadenada por ambos virus. El monitoreo cuantitativo de IgG específica y cualitativo de patrones de isotipos de IgG, así como la detección de ADN viral en muestras de plasma y saliva, fueron importantes para conocer la actividad de HHV-6 y HHV-7 en el marco de la historia natural de la persistencia en el hospedero inmunocompetente.

La hipótesis inicial del presente proyecto tuvo continuidades y rupturas, continuidades en tanto el hospedero desarrolla una respuesta de isotipos de IgG específica para HHV-6 y HHV-7 determinada por la actividad viral; es decir, el estadio del ciclo replicativo de HHV-6 y HHV-7 en glándulas salivales o en células del sistema inmune inducen un cambio en el patrón de isotipos de IgG específica. Sin embargo también rupturas, pues fue posible caracterizar diferentes modelos de infección para HHV-6 y HHV-7 en población sana, no descriptos con anterioridad. Lo que es más, estos modelos tuvieron la impronta de los grupos etarios, de tal modo que la pertenencia del sujeto al grupo A (rango entre 18 - 60 años) o al grupo B (rango entre 68 - 93 años) explicó los resultados.

El HHV-6 desarrolló en el grupo A un modelo de infección persistente latente, mientras en el grupo B lo hizo según un modelo de infección persistente crónico.

La infección por HHV-7 tanto en el grupo A como en el grupo B correspondió a un modelo persistente crónico.

La primera demostración de la existencia de los virus animales fue publicada en 1898 por F. Loeffler y P. Frosch (77). Por un encargo del gobierno alemán estos hombres diseñaron, en el marco de los postulados de Koch, el primer experimento para la demostración de los agentes virales como causas etiológicas. Ellos demostraron que la fiebre aftosa en las vacas podía reproducirse "in vivo" desde el material proveniente de las

vesículas del animal enfermo. Finalmente, la teoría expuesta por Louis Pasteur según la cual toda enfermedad infecciosa tiene su causa (etiología) en un germen con capacidad para propagarse entre las personas daría continuidad a aquel devenir histórico.

Con estas líneas de pensamiento es posible articular un comienzo de la microbiología que permite llenar ese espacio vacío que la mirada clínica buscaba para relacionar lo visible (la enfermedad) con lo invisible (ahora visible, los microorganismos).

Canguilehm Georges, filósofo y médico, refiere “podría afirmarse que la teoría microbiana de las enfermedades contagiosas debió por cierto una parte no desdeñable de su éxito a lo que en ella hay de representación ontológica del mal” (78). Además cuando se pensaba en un virus, se pensaba en un objeto estable, idéntico a sí mismo que entra y sale del hombre como a través de una puerta, que es breve en el tiempo y produce una enfermedad determinada.

Desde aquel lejano comienzo, casi todos los estudios analizaron esta interacción basados en la mirada patogénica de los virus y su impacto en salud humana; lo cual sesgó su interpretación, pues limitó su visibilidad a la de eventos clínicos determinados y a un pensamiento, donde el evento de la infección era singular y limitado. Sin embargo, el advenimiento de nuevas metodologías moleculares permitió abrir una nueva ventana en la comprensión de los virus y sus efectos en el hospedero. Precisamente en el hospedero las infecciones virales revelaron un devenir complejo. Complejo, en términos que podía seguir un modelado agudo, limitado en el tiempo, o bien persistente, en el que virus y hospedero mantenían un vínculo “extraño” durante muchos años o toda la vida del sujeto infectado.

Estudios posteriores revelaron que la persistencia viral, acontece después del primer evento de infección aguda, esto es luego de la primoinfección, aspecto que estableció un nexo entre lo agudo y lo persistente con nuevas incógnitas. En estas incógnitas se encontraba la diseminación viral que se produce luego de la multiplicación inicial en epitelios o mucosas. Esta diseminación viral clásicamente fue caracterizada como (i) el acceso del virus a sangre, viremia primaria, que permite al agente llegar a su órgano blanco o al tejido linfoide y (ii) viremia secundaria, el agente ahora se replica desde en el tejido linfoide y accede al torrente sanguíneo.

En la persistencia viral la capacidad del virus para su transmisión a otros hospederos se mantenía. Sin embargo fue menester separar a (i) la infección latente que comprendía períodos de actividad viral y transmisión, con períodos de silencio, con virus no detectables, de (ii) la infección crónica que comprendía una continua replicación viral con virus transmisibles y detectables, todo en el contexto de una infección que se desarrollaba luego que la infección tuvo un período agudo.

Hasta el momento, las publicaciones refieren que la persistencia viral no ocurre al azar, sino más bien en sitios en donde la respuesta inmune accede con dificultad, los llamados sitios inmunológicamente “privilegiados” (79). El concepto de inmunoprivilegio, está relacionado con la idea que el sistema inmune es selectivamente ineficiente para la “limpieza viral” en algunos tejidos, aspecto que juega un papel importante en la patogénesis de muchos virus, en particular los que infectan de modo persistente (80). Esto podría ser el resultado tanto de una estrategia viral, como la latencia en neuronas que produce el virus Herpes Simplex o varicela-zoster, entre otros, como de una limitación en la eficacia del sistema inmune, que se ve reflejada en las neuronas que no expresan moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (CMH I) o bien tejidos no vascularizados como los epitelios queratinizados y los glandulares (81). De este modo células y tejidos como las neuronas, el tejido nervioso, las células del sistema inmune y las células de las glándulas salivales son sitios en los que es frecuente la persistencia viral (82).

La persistencia viral para HHV-6 y HHV-7 ha sido poco caracterizada en población sana mientras que abundan publicaciones de su importancia en patología humana (39, 53-55, 58).

Mediante el estudio transversal en población sana, la cual fue categorizada en grupos etarios denominados como grupo A y grupo B y complementado esto con un estudio longitudinal, fue posible conocer las estrategias de su persistencia.

En el grupo A, adultos, la detección del ADN de HHV-6B en el 15% de las muestras de saliva (Tabla 8) y su ausencia en plasma señala a las glándulas salivales como sitios de persistencia viral, sitios que por su inmunoprivilegio mantienen en forma esporádica la replicación de HHV-6. El seguimiento de los individuos confirmó estos hallazgos. En este

sentido el marco teórico anterior explica el comportamiento viral, como una infección latente y coincide con trabajos realizados previamente a este respecto (83, 84).

La detección de ADN de HHV-7 en el 100 % de las muestras de saliva continúa el hilo conductor de aquel análisis. Sin embargo, este hilo conductor no puede explicar la detección del ADN de HHV-7 en el 90 % de las muestras de plasma (Tabla 8), resultado no conocido con anterioridad; y de este modo pone entre signos de pregunta cuál es el significado de su detección en situaciones clínicas determinadas (85).

La viremia primaria y secundaria que se producen como consecuencia de la primoinfección en los individuos sanos no puede dar cuenta de esta presencia constante de HHV-7 en plasma, confirmada también en el grupo de seguimiento. Por otra parte resulta difícil pensar al plasma como un nicho inmunoprivilegiado pues el sistema inmune es muy eficiente en mantener este sitio libre de microorganismos, por lo menos en las descripciones convencionales del mismo. Es así entonces, que el HHV-7 desarrolla un modelo crónico de infección, cuyos sitios de persistencia son tanto las glándulas salivales como linfocitos T CD4, estos últimos mantienen una replicación activa en plasma.

En el grupo B, la detección del ADN de HHV-6B en el 72,2 % de las muestras de plasma, (Tabla 8), individuos adultos mayores, continúa con esta discusión, sólo que se trata de un virus que en la población del grupo A, individuos adultos, no era detectable (Tabla 8). Estas diferencias señalan que el HHV-6 en adultos mayores produce una infección crónica en contraste con la infección latente observada en otras edades y en el seguimiento.

La detección del ADN de HHV-6B en las muestras de plasma del grupo de adultos mayores sanos es un resultado no conocido con anterioridad; lo cual pone entre signos de pregunta cuál es el significado de su detección en situaciones clínicas determinadas como en terapias inmunosupresoras (86).

Los títulos de anticuerpos IgG y su MGT para HHV-6 y HHV-7 se comportaron de un modo independiente, como lo demuestran los diferentes tipos de respuesta de IgG específica así como los ensayos de la puesta a punto de la inmunofluorescencia.

La respuesta inmune del hospedero para HHV-6 en los dos grupos se mantuvo tal como es esperable en todo modelo persistente latente, sin diferir sus valores MGT entre los grupos estudiados (Figura 11).

Los resultados obtenidos en el seguimiento concuerdan con los obtenidos en el modelo transversal representados por el grupo de adultos. En el modelo longitudinal se puede observar que el 30% de los individuos tiene en algún momento un aumento significativo del título de IgG específica, definida esta situación como una seroconversión (Tabla 9), todo lo cual avala un modelo persistente latente en donde la respuesta inmune es probable que refleje los desafíos antigénicos provenientes de la reactivación en glándulas salivales.

La respuesta inmune contra HHV-7 tuvo un comportamiento diferente en los dos grupos etarios considerados, ya que tanto el título de IgG específica como la MGT fueron mayores en el grupo de adultos mayores (grupo B) en comparación con los valores encontrados para el grupo de adultos (grupo A) ($p < 0,0001$). Es probable que el estímulo antigénico prolongado de HHV-7 en plasma sea el responsable de este cambio cuantitativo de la respuesta, la que no se observa en HHV-6.

Analizado con más detalle, podemos establecer que luego de un estímulo antigénico agudo, los linfocitos T específicos comienzan una expansión clonal, de tal modo que un linfocito T virgen puede generar más de 10^5 células T efectoras (87-89). Sin embargo, una vez que el patógeno es eliminado más del 90% de estas células son eliminadas por apoptosis, que progresivamente lleva a una contracción de aquellos clones linfocitarios específicos. El resto del repertorio de células T específicas permanece dentro de un “pool” de células T de memoria, de bajo nivel.

En contraste, si el patógeno no es eliminado, como es el caso de HHV-7, luego de la contracción inicial de los clones linfocitarios, el estímulo constante de la respuesta inmune debido a una carga de virus importante que se mantiene en sangre, lleva en el tiempo a un aumento o sobrecarga de células T específicas de memoria. Esta actividad se observa en la respuesta adaptativa, que posee la característica de memoria.

Los clones linfocitarios que aumentan corresponden a linfocitos TCD8 y en menor

medida a los clones de linfocitos TCD4, todos linfocitos T de memoria que exhiben el fenotipo característico y la distribución típica de estas células, esto es en sangre y tejidos pero no en órganos linfoides secundarios.

¿Cuál es la importancia de este aumento de clones linfocitarios específicos de memoria? ¿Retienen su capacidad efectora?, además ¿son responsables de una respuesta de IgG cuantitativa y cualitativa adecuada en el hospedero al estímulo y a la patogenicidad viral?

Cuando el hospedero ha tenido en su vida una persistente estimulación antigénica, en edades avanzadas aquel estímulo aún presente puede inducir una sobrecarga o “inflación” de los clones específicos de células T de memoria como así también un “agotamiento” clonal de linfocitos T (90, 91). Los resultados nos hablan que los virus persistentes pueden contribuir a una reestructuración de clones linfocitarios T de memoria específicos caracterizados por un aumento del “pool” así como también a un agotamiento de tales clones (92). Pareciera que para el virus HHV-7 esta reestructuración de los clones linfocitarios T de memoria, más que un agotamiento y un estado de inmunosupresión, da lugar a una respuesta hiperinmune reflejada en un cambio cuantitativo y cualitativo de anticuerpos de tipo IgG específicos en el grupo de adultos mayores, quizás como inicio a las respuestas de las preguntas planteadas.

La respuesta cualitativa de IgG para HHV-7 en el grupo A, tuvo un perfil de isotipos de IgG1 (100%) e IgG3 (32,5%) que podrían significar la respuesta del sistema inmune a la presencia crónica del virus en plasma. En el grupo B, de adulto mayor, tuvo un perfil de isotipos de IgG1 (100%), IgG3 (58,8%) e IgG4 (29,4 %) quizás como el resultado de una sobrecarga o “inflación” de los clones específicos de células T de memoria ante el estímulo persistente del virus antes referido.

La respuesta cualitativa de IgG para HHV-6 en el estudio transversal mostró en el grupo A, un perfil de isotipos de IgG1 (100%). El estudio longitudinal, cuya población se relaciona con este grupo, por las edades consideradas, la aparición de IgG3 (50%) e IgG4 (40%) se relaciona con la seroconversión observada en los individuos a través del tiempo en que fueron estudiados.

En publicaciones anteriores fue estudiada la reactivación de HHV-6 en muestras de pacientes trasplantados de médula ósea los que presentaron seroconversión de IgG anti HHV6, revelando un patrón de isotipo representado por IgG1 e IgG4 en el 100% de las muestras. Además, en los pacientes trasplantados con títulos estables de IgG se caracterizó la presencia del isotipo IgG1, situación comparable cualitativamente a la observada en la población normal (65).

La respuesta cualitativa para HHV-6 en el grupo B, de adultos mayores, con un crónico desafío antigénico en plasma del virus, tuvo un perfil de isotipos de IgG1 (100%), IgG3 (70,06%) e IgG4 (58,8%) en el estudio transversal relacionándose nuevamente con esta estimulación crónica viral.

A esta altura de la discusión, el relato ha adquirido mucha complejidad por ello recurre ahora al análisis conjunto de las variables observadas.

El análisis de correspondencias múltiples permitió, precisamente disminuir la complejidad al analizar la dependencia o independencia de las variables representadas en un punto en el espacio que reflejó las relaciones existentes con los grupos etarios considerados.

De este modo la detección de ADN de HHV-6B en plasma, así como los isotipos IgG3 e IgG4 para HHV-6 e IgG4 para HHV-7, se ubicaron próximos al grupo B en contrapartida a lo observado en el grupo A (Figura 12).

Pensar una “anatomía de la persistencia viral” lleva a un zigzag por diversos conceptos, que tienen una zona de proximidad o umbral en que se solapan uno en otro, y la tarea es precisamente construir puentes sobre estos sitios, puentes que tengan su origen en el presente trabajo. El primero es pensar una particular estrategia de replicación viral; esto es, en lugar de lisar a la célula hospedera, el patógeno causa un daño pequeño que le permite permanecer en la célula. El segundo, es que la respuesta inmune “no reacciona” a fin de eliminar a las células infectadas permitiendo, de esta manera, un modelo persistente de interacción con el hospedero. Y el tercero es que el hospedero tolera un desafío crónico de la respuesta inmunitaria y puede activar señales antiinflamatorias a fin de evitar patologías por complejos inmunes.

Como refiere Oldstone (93) el conocimiento de cómo los genes virales y los genes celulares interactúan para permitir la persistencia es aún incompleto y parcial. Una visión con más detalle del sistema inmune y de los mecanismos inmunoregulatorios utilizados por HHV-6 y HHV-7 nos permite acercarnos a conceptos respecto al significado de los hallazgos de esta tesis, como un intento de describir esta anatomía de la persistencia viral, por un perímetro de conceptos que tienden puentes provisorios para su comprensión.

Los mecanismos inmunoregulatorios utilizados por HHV-6 y HHV-7 son múltiples y operan en diferentes planos: (a) en los linfocitos TCD4 en donde se replican como ciclo lítico (94), (b) en las células susceptibles, en las cuales produce una infección no productiva como consecuencia de una restricción intracelular que opera más allá del sitio de entrada. Esto ocurre en las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos), linfocitos TCD8, células del sistema mononuclear fagocítico (95) o (c) a través de la simple interacción de la membrana celular con proteínas virales (96), lo que puede ocurrir con los linfocitos B u otros clones celulares.

Es posible que las células infectadas en la primoinfección luego establezcan un bloqueo de la síntesis de proteínas virales, como una “vuelta atrás”, pues la célula permisiva deja de serlo (96). Lo que es más, recientemente se ha propuesto un nuevo receptor para el HHV-6B, la molécula CD134, que se expresa en linfocitos T activados, aspectos que abren nuevas incógnitas (97) en razón de que se ha descrito que su bloqueo tiene una importante actividad antiinflamatoria (98).

Todo lo expresado se solapa en la proximidad de conceptos más complejos que median para la comprensión del modo en que estos virus pueden interferir con funciones inmunológicas tales como (a) la modulación de las moléculas de superficie esenciales para la activación de los LT, (b) la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas y (c) la modulación de la síntesis de citoquinas en las sinapsis inmunológicas.

(a) La modulación de las moléculas de superficie esenciales para la activación de los LT opera en la presentación de antígenos en células infectadas y es un sitio diana de la inmunoevasión que estos virus logran en el hospedero. Los herpesvirus codifican proteínas que específicamente interfieren con la presentación antigénica en el contexto de CMH tipo I. El producto del gen U21 de HHV-7 denominada inmunoevasina U21, es estructuralmente

una proteína similar a las moléculas del CMH I y se une con alta afinidad a las CMH I del hospedero, que finalmente son degradadas en los lisosomas (99). La misma inmunoevasina interfiere además con el reconocimiento que las células citolíticas naturales (NK) hacen de las células infectadas por HHV-7 uniéndose a ligandos presentes en su membrana celular, los que dirige hacia el compartimiento lisosomal.

El HHV-6 posee también una proteína con homología a la descrita para HHV-7 que con un mecanismo similar interfiere con la presentación antigénica removiendo las estructuras necesarias de la superficie celular (100).

La inmunomodulación puede ser un puente conceptual que permita comprender, en el modelo longitudinal, el aumento en el título de IgG y la aparición de diferentes isotipos de IgG, que suceden en el tiempo simultáneamente con la aparición de ácidos nucleicos virales en plasma, de tal modo que el hospedero no logra la “limpieza viral”.

Por otra parte, la presencia de antígenos de origen intracelular asociados a moléculas del CMH así como de señales coestimuladoras y la producción de Interleucina 12 (IL12) generarán una respuesta de tipo LT cooperador tipo 1 (LTh1) que inducirá la síntesis, en estas células, de Interferón gama (IFN- γ) y de Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Estos, a su vez, activarán la fagocitosis, la degranulación de los neutrófilos y la activación de los macrófagos por la vía clásica (M1) (101) con la síntesis de óxido nítrico (NO) y de enzimas lisosómicas que promueven acciones microbicidas. Los macrófagos M1 además liberan IL1, IL12 e IL23 y quimiocinas, todas con actividad inflamatoria.

Los isotipos de IgG activados por la respuesta LTh1 corresponden a IgG1, IgG2 e IgG3, isotipos que activan el complemento y se unen con más afinidad a los receptores Fc de las células fagocíticas. Esta actividad inflamatoria mediada por IgG1 e IgG3 corresponde a la observada frente al estímulo constante en plasma de HHV-7 en el grupo de adultos jóvenes.

Por el contrario, la presencia de antígenos de origen intracelular asociados a moléculas del CMH así como de señales coestimuladoras y de IL4 induce la proliferación de LT cooperador tipo 2 (LTh2), productores de IL4 e IL5 que inhiben los procesos

inflamatorios y activan a los macrófagos por la vía alterna (M2) (102). Los M2 sintetizan IL 10 que tiene actividad antiinflamatoria (103). Una respuesta similar se produce cuando el LT es activado por las células presentadores de antígenos (CPA) mediante la síntesis de IL10, lo cual generará una respuesta de tipo LT cooperador regulador (LTreg) (104). Los LTreg sintetizan IL10 e inhiben la respuesta inflamatoria e inducen la síntesis de IgG4.

La IgG4, es un isotipo que no activa el complemento y se une con poca afinidad a los receptores Fc.

El puente conceptual en este trabajo es que el estímulo persistente en plasma de HHV-6B y HHV-7 observado en el grupo de adultos mayores genera un perfil de IgG1 e IgG4, este último indica una actividad antiinflamatoria.

(b) Otra interferencia en las funciones inmunológicas lo realizan HHV-6 y HHV-7 por medio de diversos mecanismos que, a través de la síntesis de moléculas similares a citoquinas (viroquinas) o similares a receptores para citoquinas (viroreceptores) (105), inducen al sistema inmune a generar respuestas de tipo LTh2 o LTreg cuyos resultados son la acción antiinflamatoria y la inhibición de la respuesta de tipo LTh1.

Estos mecanismos inmunoregulatorios dan origen a la persistencia viral así como también permiten interpretar la respuesta de isotipos con actividad antiinflamatoria a la luz de aquellos eventos.

El HHV-6, luego de infectar a las células del sistema inmune utiliza estas moléculas a fin de inducir caminos celulares que faciliten su replicación a través de la síntesis de proteínas que son agonistas de receptores de quimiocinas: CCR1, CCR4, CCR5, CCR6 y CCR8 (106) expresadas en macrófagos y células dendríticas que resultan de este modo bloqueados (28, 107-109).

(c) La modulación de la síntesis de citoquinas en las sinapsis inmunológicas es uno de los aspectos que puede modificar la respuesta isotípica.

En el caso de HHV-6 lo impactante es que podría realizarlo, sin que la infección sea productiva, lo que es más, quizás a través de la sola interacción de sus proteínas con las células presentadoras de antígenos, células que son un “vínculo” entre la inmunidad innata y la adaptativa, bloqueando la síntesis de IL12, elemento clave para la respuesta LTh1, mediando entonces una polarización LTh2 (29). En este sentido, Wang y col (110),

demonstraron que los linfocitos T CD4+ estimulados por HHV-6 de individuos infectados suprimen la actividad de linfocitos T vírgenes CD4+ y CD8+ en personas no infectadas, a través un aumento en la síntesis de IL 10 y disminución de la síntesis de IFN γ (104).

En trabajos recientes publicados por Flamand y col. (111), caracterizaron una proteína del tegumento del HHV-6, la U54, con capacidad de suprimir la síntesis de IL2, interleuquina secretada por linfocitos T activados, que promueve la proliferación de LT, de LB y de NK, con un marcado efecto inflamatorio. Esto refuerza la hipótesis de supresión de la respuesta inflamatoria mediada por HHV-6B en el grupo de adultos mayores.

Justo en el límite, entre lo propio y lo extraño, la molécula de IgG nos permite construir otro puente conceptual con los resultados obtenidos.

Los anticuerpos protegen al hospedero de diferentes modos, mediante la neutralización, esto es, impidiendo el ingreso del virus a la célula, bloqueando los receptores que el microorganismo utiliza, activando el complemento mediante una serie de proteínas que va a producir poros en la membrana de los microorganismos infectados y opsonizando al patógeno para unirlo luego por su porción Fc a fagocitos y células NK. Como continuidad en la descripción de esta persistencia viral y del “quiebre” de visiones clásicas de la inmunología, situamos la mirada en la respuesta cualitativa de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

El conocimiento, que los inmunocomplejos circulantes, estimulan a los macrófagos en la síntesis de citoquinas, y que la densidad de complejos de IgG necesarios para la fagocitosis inhiben también la síntesis de IL12 y de IL10 en macrófagos activados, indica que el exceso de anticuerpos circulantes como resultado de la estimulación crónica viral induce una polarización de la respuesta inmune hacia LTh2 (112). Estos hallazgos permiten comprender que un aumento en el título de anticuerpos, como el observado para la IgG anti HHV-7 en la población adulta mayor y en las repetidas seroconversiones para ambos virus, no siempre significa una “adecuada” respuesta al estímulo antigénico en términos de “limpieza viral”. En otras palabras, la función de puente bipolar con el cual una IgG

antiviral se une al receptor Fc, tiene también el potencial de proteger a los viriones de las células infectadas de la respuesta inmune en particular en los herpesvirus (113).

Es entonces que nuevos y más complejos conceptos hacen su aparición y permiten encontrar algunas respuestas a aquellas preguntas planteadas en los párrafos anteriores respecto a ¿Cuál es la importancia de este aumento de clones linfocitarios específicos de memoria? ¿Tales clones retienen su capacidad efectora?, además ¿Son responsables de una respuesta de IgG cuantitativa y cualitativa adecuada al estímulo y a la patogenia viral? Y la ruptura se hace inevitable.

Aún cuando tradicionalmente el dominio Fc de la molécula IgG, fue considerada no variable, éste exhibe una considerable heterogeneidad que se origina justamente a partir de los diferentes isotipos de IgG. En otros términos los anticuerpos producidos en respuesta a estímulos antigénicos están caracterizados por su policlonalidad, no sólo en los dominios variables sino en las regiones constantes, regiones Fc (114). De esta manera el dominio Fc media diversas actividades efectoras a través de su unión a dos diferentes clases de receptores Fc, Fc tipo I y Fc tipo II. Sobre la base de la dominancia de un estado conformacional que el dominio Fc adopta, dos tipos de receptores de IgG son luego reconocidos con la capacidad selectiva de revelar cada uno de estos estados conformacionales. Los receptores Fc tipo I (FcRs tipo I) pertenecen a la superfamilia de los receptores de inmunoglobulinas que incluyen los receptores Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb, presentes en monocitos, macrófagos, células dendríticas y NK y un receptor inhibitorio, Fc γ RIIb, expresado en linfocitos B y células dendríticas (115).

Por otra parte los receptores Fc tipo II (FcRs tipo II) están representados por la familia de receptores tipo lectina C, que incluyen al CD209 (DC-SIGN), presente en células dendríticas y endoteliales y el CD23. Ambos se expresan cuando las células son estimuladas por la IL4 (linfocitos T, monocitos, macrófagos) y son esencialmente inhibitorios. Las señales que los distintos isotipos de IgG inician al unirse a estas moléculas median efectos que nos ayudan a la comprensión de la respuesta inmune frente a desafíos virales crónicos hallados en este trabajo. Los FcRs tipo I activados por la IgG1 median

una mayor citotoxicidad dependiente de anticuerpos así como la IgG3 hace lo propio con vías inflamatorias. Particular interés tiene la IgG4, isotipo que “quiebra las reglas” pues en lugar de ser funcionalmente monovalente tiene la capacidad de comportarse como funcionalmente bivalente a través de la unión con dos antígenos diversos, lo que disminuye el potencial patológico de la IgG4 pues resulta en complejos inmunes débiles (116, 117).

Meulenbroek LA y col (118) demostraron que complejos de anticuerpos y alérgenos generados en una respuesta como alergia alimentaria contiene IgG4 con capacidad de unirse a las células que expresan CD23 (FcRs tipo II inhibitorio), los linfocitos B y células presentadoras de antígenos, estimuladas por la IL4 secretada por los linfocitos T. La IgG 4 está estrechamente correlacionada funcionalmente a la respuesta clínica a inmunoterapia con alérgenos (119).

En otros términos, el puente conceptual con los resultados de este trabajo es que la prolongada estimulación antigénica recibida durante la vida del individuo al llegar a adulto mayor, da lugar a un cambio de isotipos de IgG, de actividad antiinflamatoria, situación similar a la observada en la inmunoterapia para alérgenos a través de sucesivos desafíos antigénicos. Estos desafíos prolongados de estimulación viral no dan lugar necesariamente a similares respuestas isotípicas (120). Aberle y col proponen que el desafío crónico de Citomegalovirus (CMV), virus que está relacionado a HHV-6 y HHV-7 con quienes integra la subfamilia *Betaherpesvirinae*, en adultos mayores, induce un aumento en el título de anticuerpos específicos con isotipos IgG1 e IgG3 que han sido correlacionados con fragilidad del sistema inmune y un perfil de riesgo asociado a mayor mortalidad (121). Sin embargo, la respuesta en el grupo de adultos mayores incluyó además a la IgG4 para HHV-6 y HHV-7 en el modelo crónico, esto estaría señalando una fina sintonía para ejercer efectos antiinflamatorios, que prevengan lesiones inmunopatológicas en el sistema estudiado.

Finalmente, tan solo la unión cruzada entre los isotipos de IgG y los FcRs produce, en diferentes poblaciones de células macrofágicas, la inhibición de IL12 e IL10 por diferentes mecanismos que actúan con distinta densidad de anticuerpos (122). Además esta

estrategia del aumento de síntesis de IL 10 es uno de los aspectos inmunomodulatorios

implicados en la persistencia de otros virus como el virus de la coriomeningitis linfocitaria (93).

Los resultados refieren una actividad de ambos virus en la población sana, caracterizada por seroconversión, movimiento de isotipos, presencia de ADN viral tanto en saliva como en plasma. Ambos virus desarrollan una actividad independiente uno del otro dentro del mismo individuo. El cambio de isotipo en la respuesta inmune humoral es un proceso altamente regulado por citoquinas e interacción de moléculas pertenecientes tanto al virus como al hospedero, el cual, según su grupo etario, modela un tipo y naturaleza de respuesta isotípica según la actividad viral. Respuesta inmune que “*a posteriori*” de este estímulo, sin intervenir ya antígeno alguno, posee desde lo cuantitativo y lo cualitativo la capacidad de generar respuestas de tipo Th2 y Threg, encargadas de una actividad antiinflamatoria.

Todos los caminos conducen a una tolerancia antigénica que el hospedero sano realiza a fin de limitar posibles daños inmunopatológicos, daños que algunos autores han informado asociados a la reactivación o actividad crónica viral (como reacciones autoinmunes asociadas a fármacos, Linfadenitis de Kikuchi, tiroiditis) (123-126). Esto se pudo observar también en el estudio longitudinal que otorgó elementos de análisis en este sentido.

Esta es la situación planteada por HHV-6 y HHV-7, que lejos de representar sistemas estáticos, son sistemas en constante movimiento, que utilizan estrategias virales de infección latente e infección crónica en diferentes tejidos y poblaciones celulares; ya sea que pertenezcan a órganos, como glándulas salivales o células circulantes como las poblaciones linfocitarias en plasma. Su presencia en el plasma de la población sana, abre nuevos interrogantes respecto a su interpretación en situaciones clínicas determinadas o su eventual transmisión por vía sanguínea, como por ejemplo en transfusiones o en donación de órganos. En otros términos esta tesis aporta elementos objetivos para conceptualizar al individuo sano como una fluctuación de situaciones, las que podrían anticipar posibles complicaciones en pacientes inmunocomprometidos, trasplantados o bajo tratamiento prolongado con drogas inmunosupresoras.

Todo lo referido señala que tanto el HHV-6 como el HHV-7, son virus que han co-evolucionado con el hombre de una manera particular, con una sintonía que les permite ajustar su actividad y la respuesta inmune subsiguiente a la edad del hospedero. Esta

interacción dinámica podría incluir a estos virus como integrantes del denominado viroma humano. En este sentido durante la co-evolución con el humano en cercanías de su genoma, esto es, dentro de la membrana nuclear, han adquirido genes mediante los cuales pueden suprimir la respuesta inmune y de esta manera pasar a formar parte de un “presupuesto” del que pueden hacer uso quizás también para disminuir los “costos” que una reacción inflamatoria tendría tanto para el hospedero como para el virus, conduciendo el destino hacia un camino de relación prolongada entre continuidades y rupturas.

4.1 Conclusiones

Fue posible caracterizar diferentes modelos de infección para HHV-6 y HHV-7 en población sana mediante el estudio de un modelo transversal que incluyó una población adulta joven con una media de edad de 36 años, y una población adulta mayor con una media de edad de 79 años.

Los modelos de infección tuvieron la impronta de los grupos etarios en tanto detección de ADN viral y respuesta inmune cuantitativa y cualitativa (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

- ✚ El comportamiento de HHV-6 en la población adulta joven se caracterizó por un modelo de latencia, mientras que en la población adulta mayor, se caracterizó por un modelo de cronicidad.

El comportamiento de HHV-7 en ambas poblaciones se caracterizó por un modelo de cronicidad.

- ✚ La presencia persistente de ADN de HHV-7, en la población adulta mayor desencadena, por parte del sistema inmune, un aumento significativo en el título de IgG específica.

La presencia persistente de ADN de HHV-7, en la población adulta joven desencadena, por parte del sistema inmune, de una respuesta tipo T helper 1, citotóxica.

El perfil de isotipos IgG1, IgG3 e IgG4 en la población adulta mayor, tanto para HHV-6 como para HHV-7 es consecuencia de la estimulación crónica que genera la presencia sostenida del ADN viral en plasma.

La presencia de IgG3 es consecuencia de la activación de los clones linfocitarios específicos para cada virus estimulados con anterioridad.

La presencia de IgG4 responde a una respuesta supresora mediada por los linfocitos T reguladores (Linfocitos Treg) que generan una acción de bloqueo sobre los sitios antigénicos, a fin de prevenir posibles daños inmunopatológicos.

✚ Las infecciones persistentes en individuos sanos, y en particular aquellas causadas por HHV-6 y HHV-7, lejos de representar sistemas en equilibrio constituyen sistemas en constante movimiento, que utilizan estrategias virales de infección latente e infección crónica en diferentes tejidos y poblaciones celulares.

Esta activación crónica del sistema inmune, no logra erradicar los antígenos virales y el hospedero debe reducir la probabilidad de lesiones inmunopatológicas. Esto adquiere particular relevancia cuando se trata de virus que coevolucionaron con el hombre y poseen mecanismos de inmunomodulación en las poblaciones linfocitarias que infectan.

Algunos virus son una parte de nuestro viroma, sin embargo, en determinadas circunstancias, pueden cambiar su perfil y adquirir un papel patogénico.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Beijerinck MW. Concerning a contagium vivum fluidum as cause of a spot disease of tobacco leaves. *Phytopathological classic*, 7; Johnson J American Phytopathological Society St Paul MN USA. 1898.
- 2- Katze M. Playing the waiting game. *Curr Opin Virol.* ; 3: 377-379, 2013.
- 3- Chaston T, Lidbury B. Genetic budget of viruses and the cost to the infected host: a theory on the relationship between the genetic capacity of viruses, immune evasion, persistence and disease. *Immunol Cell Biol*; 79: 62-66, 2001.
- 4- McGeoch DJ, Gatherer D. Integrating reptilian herpesvirus into the family herpesviridae. *J Virol*; 79: 725-731. 2005.
- 5- Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol*; 9: 187-199, 1999.
- 6- Falke D, Siegert R, Vogell W. [Electron microscopic findings on the problem of double membrane formation in herpes simplex virus]. *Arch Gesamte Virusforsch*; 9: 484-496, 1959.
- 7- Furlong D, Swift H, Roizman B. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol*; 10: 1071-1074, 1972.
- 8- Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesvirus. In Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al, eds. *Human Herpesvirus: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 27-43, 2007.
- 9- Mettenleiter TC. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol*; 113: 163-169, 2005.
- 10- Liu ST, Sharon-Friling R, Ivanova P, et al .Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus virion reveals a role for SNARE machinery in virion egress. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108, 12869-12874, 2011.
- 11- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol*; 154:171-177, 2009.
- 12- Pellet PE, Davison AJ, Eberle R, et al. Order: Herpesvirales. In King AMQ, Adams MJ, Cartens EB, et al, eds. *Virus Taxonomy: Ninth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier; 99-107, 2012
- 13- Davison DJ. Herpesvirus systematic. *Vet Microbiol*; 143(1-2): 52-69, 2010.

- 14- Nevels M, Nitzsche A, Paulus C. How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Red Med Virol*; 21: 158-80, 2011.
- 15- Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markhan PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*; 234: 596-611, 1986.
- 16- Josephs SF, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Schachter F, Wong-Staal F, Gallo RC. Genomic analysis of human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*; 234: 601-603, 1986.
- 17- Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human Herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*; 10: 521-567, 1997.
- 18- Ablashi DV, Salahuddin SZ, Josephs SF, Imam F, Lusso P, Gallo RC. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature (Lond.)*; 329: 207, 1987.
- 19- Lusso P, Markham PD, Tschachler E, Di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (Human Herpesvirus 6). *J Exp Med*; 167:1659-1670, 1988.
- 20- Lusso P, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Gallo RC. Diverse tropism for HBLV (human herpesvirus 6). *Lancet*; 743, 1987.
- 21- Romagnoli PA, Nates SV, Paván JV, Serra H. Seroprevalence of human herpesvirus 6 in Andino-Puneños (Argentina). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 94:1-4 2000.
- 22- Ablashi AD, Balachandran N, Josephs SF et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*; 184: 545-552, 1991, 1993.
- 23- Aubin JT, Collandre H, Candotti D et al. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* ; 29: 367-372, 1991.
- 24- Chandran B, Tirawatnpong S, Pfeiffer B, Ablashi DV. Antigenic relationships among human herpesvirus-6 isolates. *J Med Virol*; 37: 247-254, 1992.
- 25- Adams AJ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 157:1411-1422, 2012.
- 26- Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH. Isolation of a new herpesvirus from human CD4 T cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*; 87: 748-752, 1990.

- 27- Clark DA Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol*; 10:155-173, 2000.
- 28- Caselli E, Di Luca D. Molecular biology and clinical associations of Roseolovirus human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiological*; 30: 173-187, 2007.
- 29- Menegazzi P, Galvan M, Rotola A et al. Temporal mapping of transcripts in human herpesvirus -7. *J General Virol*; 80: 2705-2712, 1999.
- 30- Campadelli-Fiume G. Virus receptor arrays, CD46 and human herpesvirus 6. *Trends in Microbiology*; 8 (10):436, 2000.
- 31-Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol*; 11 (7): 1001-1006, 2009.
- 32- Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati M, Berger EA, Lusso P. CD46 Is a Cellular Receptor for Human Herpesvirus 6. *Cell*; 99: 817–827, 1999.
- 33- Alessio Lax A, Carricart S, Bustos D, Nates S, Gendelman H, Medeot S, Pavan J. Loss of Maternally Derived Human Herpesvirus 6 Immunity and Natural Infection in Argentinian Infants. *International J Infect Dis*; 5 (4): 200-202, 2001.
- 34- Bustos D, Biganzoli P, Carricart SE, et al. Loss of maternally derived Human Herpes Virus 7 immunity and natural infection in Argentinian infants. *Int J Infect Dis*; 10(5):354-7, 2006.
- 35- Carricart S E, Bustos D, Grutadauria S, et al. Circulación del virus herpes 6 humano en adultos normales y en pacientes oncológicos. *Medicina (Buenos Aires)*; 62: 9-12, 2002.
- 36- Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol*; 66: 3206-3209, 1992.
- 37- Yamamishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y. Identification of human herpesvirus -6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*: 1065-10679, 1998.
- 38 - Suga S, Suzuki K, Ihira M et al. Clinical characteristic of febrile convulsions during primary HHV-6 infection. *Arch Dis Child*; 82: 62-66, 2000.
- 39- Suga S, Yoshikawa T, Asano Y et al. Clinical and virological analysis of 21 infants with exanthema subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol*; 33:597-603, 1993.
- 40 -Yoshikawa T, Ohashi M, Miyake M et al. Exanthem subitum associated encephalitis: nationwide survey in Japan. *Pediatr Neurol*; 41:353-358, 2009.
- 41 -Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Matsubara T, Furukawa S, Asano Y. Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. *Arch Dis Child*; 83: 170–171, 2000.

- 42 -Miyoshi I, Tanaka- Taya K, Hara J, et al. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) and Human Herpesvirus 7 (HHV-7): inverse relationship between human herpesvirus 6 and 7 detection after allogenic and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*; 27: 1065-1070, 2001.
- 43- Cermelli C, Berti R, Soldan S, Mayne SK, Jacobson S. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in Multiple Sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis*; 187: 1377-1387, 2003.
- 44 - Ward KN Human herpesvirus 6 and 7 infections. *Curr Opin Infect Dis*; 18: 247-252, 2005.
- 45 - Magalhaes I, Martins R, Cossatis R, et al. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*; 105: 925-927, 2010.
- 46 - Kramble RT, Clark DA, Leong HN et al. Transmission of integrated human herpesvirus-6 in allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*; 40: 563-566, 2007.
- 47- Hall CB, Caserta MT, Schabel KC, et al. Transplacental human herpesvirus 6(HHV-6) congenital infection caused by maternal chromosomally integrated virus. *J Infect Dis*; 201:505-507, 2010.
- 48 - Arbuckle J, Medveczky MM, Luka J et al. The latent human herpesvirus 6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital. Boston, 2010.
- 49 - Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H et al. Human herpesvirus 6A (HHV-6) is transmitted from parents to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6A DNA. *J Med Virol*; 73:465-473, 2004.
- 50 - Adams O, Krempe C, Hogler G et al. Congenital infection with human herpesvirus 6. *J Infect Dis*; 178:544-546, 1998.
- 51 - Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Lofthus G, McDermott MP. Human herpesvirus 6 and 7 (HHV-6 and HHV-7) infections in pregnant women. *J Infect Dis*;196:1296-303, 2007.
- 52 - Chen T, Hudnall DS. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Modern Pathology*; 19:726-737, 2006.
- 53 - Ward KN. Human herpesviruses-6 and -7 infections. *Curr Opin Infect Dis*; 18:247-252, 2005.

- 54- Abdel Massih A, Razonable R. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World Gastroenterol*; 15 (21): 2561-2569, 2009.
- 55 - De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human Herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin Microbiol Rev*; 18: 217-245, 2005.
- 56- DI Luca D, Mirandola P, Ravaioli T et al. Human herpesvirus 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individual. *J Med Virol*; 45:462-468, 1995.
- 57- Sada E, Yasukama M, Ito C et al. Detection of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in the submandibular gland, parotid gland and lip salivary gland by PCR. *J Clin Microbiol*; 34:2320-2321, 1996.
- 58- Mukai T, Yamamoto T, Kondo T, Kondo K et al. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol*; 42: 224-227, 1994.
- 59- Takahashi Y, Yamada M, Nakamura J, et al. Transmission of human herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household. *Pediatr Infec Dis J*; 16: 975-978, 1997.
- 60- Ward KN, Turner DJ, Couto Parada X, Thiruchelvam AD. Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol*; 39: 959-963, 2001.
- 61- Yasukawa M, Ohminami H, Sada E et al. Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood*; 93: 991-999, 1999.
- 62- Zerr D, Fann J, Breiger D et al. HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*; 117: 5243-5249, 2011.
- 63- Yamane A, Mori T, Suzuki S et al. Risk factor to developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. *Biol Blood Marrow Transplant*; 13:100-106, 2007.
- 64- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*; 449: 819-826, 2007.
- 65- Carricart SE, Bustos D, Biganzoli P, et al. Isotype immune response of IgG antibodies at the persistence and reactivation stages of Human Herpes Virus 6 infection. *J Clin Virol*; 31:266-9, 2004.

- 66- Ferreyra L, Bustos D, Biganzoli P, Isa MB, Don P, Ribechini E, Nates SV, Pavan JV. HHV-6 IgG4 isotype response following measles infection. *J Med Virol*; 82(3): 396--399. 2010.
- 67- Meulenbroek AJ, Zeijlemaker WP. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. Published by CLB, Plesmanlaan 125, Amsterdam, 1996.
- 68- Davies A, Rispens T, Gould H, Jefferis R, Aalberse R, Sutton B. Structural determinants of unique properties of human IgG4-Fc. *J Mol Biol.*; 426: 630-644, 2013.
- 69- Jefferis R. Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Arch Biochem Biophys*; 526:159-166, 2012.
- 70- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*; 113:3716-3725, 2009.
- 71- Van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*; 317:1554-1557, 2007.
- 72- Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, et al. Detection of Human Herpesvirus 6 in Plasma of Children with Primary Infection and Immunosuppressed Patients by Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis*; 171:273-80, 1995.
- 73- Berneman Z, Ablashi DV, Li GE, et al. Human herpes virus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 89:10552-10556, 1992.
- 74- Aubin JT, Poirel L, Robert C, Huraux JM, Agut H. Identification of Human Herpesvirus 6 Variants A and B by Amplimer Hybridization with Variant-Specific Oligonucleotides and Amplification with Variant-Specific Primers. *J Clin Microbiol*: 2434-2440, 1994.
- 75- Akensson-Johansson A, Harmenberg J, Wahren B, Linde A. Inhibition of Human Herpesvirus 6 Replication by 9-[4-Hydroxy-2-(Hydroxymethyl)Butyl]Guanine (2HM-HBG) and Other Antiviral Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 34 (12): 2417-2419, 1990.
- 76- Jolliffe IT. *Principal Components Analysis*. 2nd ed. New York; Springer Verlag, 2002.
- 77- Loeffler F and Frosch P. The first animal pathogenic virus: the causative agent of foot-and-mouth disease. 1898.

- 78- Canguilehm G Lo normal y lo patológico. Siglo XXI Editores Madrid Buenos Aires; 155-158, 2009.
- 79- Virgin H, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell*; 138:30-48, 2009.
- 80- Oldstone, MB, Blount P, Southern PJ, Lampert PW. Cytoimmunotheapy for persistent virus infection reveals a unique clearance pattern from the central nervous system. *Nature*; 321: 239–243, 1986.
- 81- Virgin, HW. Pathogenesis of viral infection. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, Howley PM. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins;pp. 327–388, 2007.
- 82- Virgin H. The viroma in mammalian physiology and disease. *Cell*; 157:142-150, 2014.
- 83- Aberle SW et al. Presence of himan herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of heathly adults. *J Clin Microbiol*; 34 (12): 3223-3225, 1996.
- 84- Kidd IM, Clark DA, Ait-Khaled M, Griffiths PD, Emery VC. Measurement of human herpesvirus 7 load in periphereal blood and saliva of healthy subjects by quantitative polymerase chain reaction. *J Infect Dis*; 147 (2): 396-401, 1999.
- 85- Chapenko S, Krumina A, Logina I, Rasa S, Chistjakovs M, Sultanova a, Viksna L, Murovska M. Association of Active Human Herpesvirus-6, -7 and Parvovirus B19 Infection with Clinical Outcomes in Patients with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Advances in Virology*; ID 205085, 7 page, 2012.
- 86- de Pagter PJ¹, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, Uiterwaal CS, van Baarle D, Sanders EA, Boelens J. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*;14(7): 831-9, 2008.
- 87- Jenkins MK¹, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*; 19:23- 45, 2001.
- 88- Hataye J¹, Moon JJ, Khoruts A, Reilly C, Jenkins MK. Naive and memory CD4+ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science*; 312(5770): 114-116, 2006.

- 89- Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*; 8: 512-522, 2008.
- 90- Shin H¹, Wherry EJ CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol*;19(4): 408-15, 2007.
- 91- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* ;10(1): 29-37, 2009.
- 92-Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramanian S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ Tcell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*; 27:670-684, 2007.
- 93- Oldstone M. Anatomy of Viral Persistence. *PLoS Pathogens*; 5 (7), 2009.
- 94- Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, et al. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol*; 63(7):3161-3163, 1989.
- 95- Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi k. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*; 72(Pt6):1401-1408, 1991.
- 96- Dagna L, Pritchett JC, Lusso P. Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virology*; 8 (3): 273-287, 2013.
- 97- Tang H, Wang J, Mahmoud NF, Mori Y. A detailed study of the interaction between human herpesvirus-6B glycoprotein complex and its cellular receptor, human CD134. *J Virol*; 88 (18): 10875-10882, 2014.
- 98- Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*; 28:57-78, 2010.
- 99- Kimpler A, Glosson NL, Downs D, et al. Adaptor Protein Complexes AP-1 and AP-3 are Required by the HHV-7 Immunoenvasin U21 for Rerouting of Class I MHC Molecules to the Lysosomal Compartment. *PLoS One*; 9(6):e99139, 2014.
- 100- Glosson NL, Hudson AW Human herpesvirus 6A and 6B encode viral immunoenvasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology*; 365 (1):125-35, 2007.
- 101-Duque Correa MA, Rojas López M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*; 26 (2): 73-86, 2007.

- 102- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Editorial ELSIEVER, 7^o ed. 2012 ISBN: 978-84-8086-916-4
- 103- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*;(22): 929–979, 2004.
- 104- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*; 421:388-392, 2003.
- 105- Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi K. Human herpes virus -6 open Reading frame U83 encodes a functional chemokine. *J Virol*; 73:5926-5933, 1999.
- 106- Dewin DR, Catusse J, Gompels UA. Identification and characterization of U83A viral chemokine, a broad and potent beta-chemokine agonist for human CCRs with unique selectivity and inhibition by spliced isoform. *J Immunol*; 176(1):544–556, 2006.
- 107- Smith A, Santoro F, Di Lullo G, Dagna L, Verani A, Lusso P. Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood*; 102 (8):2877–2884, 2003.
- 108 - Takemoto M, Imasawa T, Yamanishi K, Mori Y. Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission to CD4⁺ T cells. *Virology*; 385(2):294–302, 2009.
- 109- Milne RS, Mattick C, Nicholson L, Devaraj P, Alcami A, Gomples UA. RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol*; 165 (5): 2396-2404, 2000.
- 110- Wang F, Yao K, Yin QZ, Zhou F, Ding CL, Peng GY, Xu J, Chen Y, Feng DJ, Ma CL, Xu WR. Human herpesvirus-6-specific interleukin 10-producing CD4⁺ T cells suppress the CD4⁺ T-cell response in infected individuals. *Microbiol Immunol*; 50 (10): 787-803, 2006.
- 111- Iampietro M, Morissette G, Gravel A, Flamand L. Inhibition of Interleukin-2 Gene Expression by Human Herpesvirus 6B U54 Tegument Protein. *J Virol pii: JVI.02030-14*, 2014.
- 112- Casadevall A, Pirovski LA. Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends immunol*; 24(9): 474-478, 2003.

- 113- Ndjamen B, Farley AH, Lee T, Fraser SE, Bjorkman PJ. The herpes virus Fc receptor gE-gI mediates antibody bipolar bridging to clear viral antigens from the cell surface. *PLoS Pathog*; 10(3):e1003961. doi: 10.1371/journal.ppat.1003961, 2014.
- 114 - Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, et al. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*; 15(8):707-16. doi: 10.1038/ni.2939,2014.
- 115- Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G. IgG-effector functions: “The good, the bad and the ugly”. *Immunol Lett*, 2014.
- 116 - Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunol*; 105(1):9-19, 2002.
- 117- Rispens T, Davies AM, Ooijevaar-de Heer P, Absalah S, Bende O, Sutton B, Vidarsson G, Aalberse RC. Dynamics of inter-heavy chain interaction in Human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic fab arm exchange. *J Biol Chem*; 289 (9): 6098-6109, 2014.
- 118 - Meulenbroek LA, de Jong RJ, den Hartog Jager CF, et al. IgG antibodies in food allergy influence allergen-antibody complex formation and binding to B cells: a role for complement receptors. *J Immunol*; 191(7): 3526-3533, 2013.
- 119 - Shamji MH, Ljørring C, Francis JN, et al. Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy*; 67(2):217-261, 2012.
- 120 - Simon B, Kundi M, Puchhammer- Stockl E. Association of HCMV specific IgG subclass antibody levels with gender and age. *Exp Gerontol*; 48 (5): 472-475, 2013.
- 121 - Aberle JH, Puchhammer-Stöckl E. Age-dependent increase of memory B cell response to cytomegalovirus in healthy adults. *Exp Gerontol*; 47(8):6547, 2012.
- 122-Gallo P, Gonçalves R, Mosser DM. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett*; 133 (2): 70-77, 2010.
- 123- Hutchinson CB, Wang E. Kikuchi-Fujimoto disease. *Arch Pathol Lab Med*; 134:289-293,2010
- 124- Kucukardali Y, Solmazgul E, Kunter E, Oncul O, Yildirim S, Kaplan M. Kikuchi-Fujimoto disease: analysis of 244 cases. *Clin Rheumatol*; 26:50-54, 2007.
- 125- Mitani N, Aihara M, Yamakawa Y, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome due to cyanamide associated with multiple reactivation of human herpesviruses. *J Med Virol*; 3: 430-434, 2005.

126- Descamps V, Valance A, Edlinger C, et al. Association of human herpesvirus 6 infection with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms. Arch Dermatol; 3: 301-304, 2001.

Publicación derivada de este trabajo de tesis

IgG Subclasses and DNA Detection of HHV-6 and HHV-7 in Healthy Individuals

Patricia Biganzoli,^{1,2} Leonardo Ferreyra,^{1,2} Paola Sicilia,^{1,2} Claudia Carabajal,³ Susana Frattari,³ Ana Littvik,¹ Silvia Nates,² and Jorge Pavan^{1,2*}

¹Medical Bacteriology and Virology, School of Medical Sciences, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina; National University of La Rioja, La Rioja, Argentina

²Virology Institute ‘‘Dr. J. Vanella’’, School of Medical Sciences, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina

³Blood Bank, National University of Cordoba, Cordoba, Argentina

Human herpesvirus 6 (HHV-6) and 7 (HHV-7) are common opportunistic agents in immunocompromised hosts, although infection with HHV-6 and HHV-7 can also be observed in immunocompetent hosts. Despite similar biology and epidemiology, this study evaluated differences in the IgG subclass distribution associated with HHV-6 and HHV-7 in seropositive, healthy persons. The identified subclasses were also compared with the detection of HHV-6 and HHV-7 DNA. For these assays, sera, plasma, and saliva samples were obtained from 40 healthy blood donors in Argentina who were seropositive for both HHV-6 and HHV-7. HHV-6 and HHV-7 DNA were detected in saliva and plasma samples using nested PCR, and specific IgG subclasses were determined using immunofluorescent assays of sera samples. HHV-7 DNA was detected in 90% of all plasma samples and in 100% of saliva samples. In contrast, HHV-6 DNA was not detected in any of the plasma samples, and it was detected in only 6 of 40 saliva samples. Determination of IgG subclass distributions showed that HHV-6 was restricted to IgG1, whereas HHV-7 IgG subclasses included two groups, one restricted only to IgG1 and the other to IgG1 and IgG3. These results demonstrate the differences between HHV-6 and HHV-7 DNA range detection in saliva and plasma samples, as well as the IgG subclass patterns for each virus type, in healthy persons in Argentina. *J. Med. Virol.* 82:1679–1683, 2010.

© 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HHV-6; HHV-7; IgG isotypes; DNA

INTRODUCTION

Human herpesvirus 6 (HHV-6) and human herpesvirus 7 (HHV-7) are two closely related members of the Betaherpesvirinae subfamily [Caselli and Di Luca,

2007]. They are widespread in the human population and have similar biology and epidemiology [Jackson and Sommerauer, 2002]. HHV-6 causes exanthem subitum, whereas infection with HHV-7 is usually asymptomatic [Ward, 2005]. Primary infection by HHV-6 and HHV-7 occur typically early during childhood and the viruses persist by establishing latency, similar to that of other herpesviruses. During latency, HHV-6 and HHV-7 are maintained primarily in the lymphocytes and salivary glands from which they can be reactivated [Katsafanas et al., 1996; Yoshikawa et al., 1999; Chen and Hudnall, 2006]. Reactivation of these viruses has been documented extensively in immunocompromised hosts, such as patients with AIDS or recipients of bone marrow, kidney, or liver transplants [Broccolo et al., 2002; Clark, 2002; Benito et al., 2003; Savolainen et al., 2005]. However, reactivation of HHV-6 and HHV-7 has also been described in immunocompetent or healthy individuals [Wyatt and Frenkel, 1992; Aberle et al., 1996; Kidd et al., 1996; Hara et al., 2002].

Viral markers of reactivation present in lymphocytes and salivary glands are detectable by examination of DNA samples collected from blood, plasma, or saliva [Broccolo et al., 2002; Krueger and Ablashi, 2003; Ward, 2005]. Persons with viremia can be identified by detecting viral DNA in cell-free plasma specimens, by PCR. However, DNA detection in plasma does not necessarily reflect viremia [Achour et al., 2007] because

Patricia Biganzoli and Leonardo Ferreyra contribute equally to this study.

Grant sponsor: SeCyT, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; Grant sponsor: SECYT, Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina.

*Correspondence to: Jorge Pavan, Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, Santa Rosa 1095, Alberdi 5000, Córdoba, Argentina. E-mail: jorgevpavan@gmail.com

Accepted 26 May 2010

DOI 10.1002/jmv.21880

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

this DNA may have originated from lysis of circulating infected cells in the blood. Therefore, it is of interest to correlate the presence of viral DNA in body fluids with other viral markers.

Virus-specific antibodies from the four IgG subclasses have been studied at different stages of infection for a variety of viral infections, for example, measles, rubella, and hepatitis B [Linde, 1985; Isa et al., 2001; Yang et al., 2005]. IgG subclasses of human cytomegalovirus (HCMV), varicella zoster virus (VZV), and herpes simplex virus (HSV) have also been described [Sundqvist et al., 1984; Doerr et al., 1987; Joassin et al., 1989]. The IgG isotype patterns also have contributed to an understanding HHV-6 infection. An increase in HHV-6 antibody titer and a specific subclass pattern of IgG1 and IgG4 have been observed in HHV-6-seropositive bone marrow transplant patients [Carricart et al., 2004]. In contrast, transplant patients with stable levels of antibodies have only an IgG1 response. An HHV-6 IgG4 isotype response has been demonstrated following measles infection [Ferreira et al., 2010].

Comparison of HHV-6 and HHV-7 IgG subclass profiles with viral DNA detection in plasma and saliva samples provides valuable insight into the biology of HHV-6 and HHV-7 infections. The immune response at the IgG subclass level in healthy individuals has not been correlated with DNA detection profiles. Therefore, the aim of this study was to evaluate the HHV-6 and HHV-7 IgG subclass distribution patterns in relation to the detection of HHV-6 and HHV-7 DNA in plasma and saliva samples collected from healthy, seropositive Argentinian blood donors. This is believed to be the first study of HHV-7-specific IgG isotype patterns in immunocompetent individuals.

MATERIALS AND METHODS

Population Study and Samples

Subjects included 40 healthy adults (29 men and 11 women; median age: 28 years; range: 18–60 years) who were blood donors at the Blood Bank of the National University of Cordoba, Cordoba City, Argentina. All individuals were HHV-6 and HHV-7 seropositive by indirect immunofluorescence assays. Individuals presented with no history of systemic disease, infectious or non-infectious diseases, or autoimmune syndromes. Whole saliva, serum, and plasma samples were collected from each individual. Saliva (1 ml) was obtained without any stimulus by spitting the collected saliva into sterile containers, and peripheral blood (5 ml) was collected into either an EDTA tube or a plain tube for the isolation of plasma or serum, respectively. All samples were stored at -20°C until analyzed.

Participants were informed of the nature and purpose of the serological investigations. Voluntary informed consent for participation in the studies was obtained from each individual in accordance with the ethical principles enumerated in the Declaration of Helsinki and the additional requirements of local and national

authorities (National Normative 5330/97, National Administration of Food, Medicine and Technology).

DNA Extraction

DNA was extracted from 0.5 ml of plasma or saliva using a phenol–chloroform protocol. Briefly, each sample was resuspended in 0.5 ml extraction buffer [10 mmol/L Tris–HCl (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 0.1% SDS] and vortexed. After 10 min at room temperature, 1 ml phenol–chloroform was added. After 30 min at 56°C , the mixture was centrifuged at $12,000g$ for 30 min and the aqueous phase was separated. After overnight incubation of the samples with absolute ethanol at -20°C , samples were pelleted by centrifugation at $12,000g$ for 30 min. Ethanol was discarded and the precipitated DNA was air dried and resuspended in 50 ml double-distilled water. All DNA extracts were stored at -20°C .

Detection of HHV-6 and HHV-7 DNA

HHV-6 and HHV-7 DNA were detected in saliva and plasma samples by nested PCR using primers that target the major capsid protein gene for HHV-6 (Secchiero et al., 1995) and U10, an a gene, for HHV-7 (Berneman et al., 1992). The first set of primers for detection of HHV-6 included EX1 (forward primer), 5^{\prime} -AAGATGGCCACCCCTCGATGATGCCGAGT- 3^{\prime} , and EX2 (reverse primer), 5^{\prime} -CACTTATGTGGTGGCGTTGCCGGCCGAGAACGG- 3^{\prime} . The first set of primers for detection of HHV-7 included HV7 (forward primer), 5^{\prime} -TATCCCAGCTGTTTTTCATATATAGTAAC- 3^{\prime} , and HV8 (reverse primer), 5^{\prime} -GCCTTGCGGTAGCACTAGATT-TTTTG- 3^{\prime} . For each reaction, a total of 50 ml contained 10X PCR buffer, 400 mM dNTPs, 0.2 mM primers, 0.6 ml MgCl_2 (50 mM), and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). For HHV-6, a total of 40 cycles included denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. For HHV-7, a total of 40 cycles included denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min. The second PCR primer set for HHV-6 included IN1 (forward primer), 5^{\prime} -CACATCGCCGGA-CAGGATGCTTCGGAGTA- 3^{\prime} , and IN2 (reverse primer), 5^{\prime} -GTGTTGTGAGCCATGGGGAAGAAGGTGGC- 3^{\prime} . For HHV-7, the second PCR primer set included HV7N1 (forward primer), 5^{\prime} -ACCAATTCAGTTTTTCATCCAG- 3^{\prime} , and HV8N2 (reverse primer), 5^{\prime} -TTGAAGAGGAGAAT-TCTGTAC- 3^{\prime} . Reactions were performed in a total volume of 50 ml that contained 10X PCR Buffer, 200 mM dNTPs, 0.2 mM primers, 0.6 ml MgCl_2 (50 mM), and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). For HHV-6, a total of 40 cycles included denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. For HHV-7, a total of 40 cycles included denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min. HHV-6 or HHV-7 positive and negative controls were processed in parallel in each reaction.

For the analysis of amplified DNA, a 10-ml aliquot was subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel that contained ethidium bromide. For HHV-6, bands were predicted at 521 and 267 bp for the first and second PCR assays, respectively. For HHV-7, bands were predicted at 186 and 110 bp for the first and second PCR assays, respectively. Bands were visualized on an UV transilluminator. The PCR assay sensitivity was tested using plasmids that contained the HHV-6 or HHV-7 DNA sequences. The detection limit was set at 10 copies of plasmid DNA/reaction for HHV-6 and HHV-7 PCR assays. HHV-7 PCR specificity was tested by digesting the first PCR product (186 bp) with EcoRI restriction enzyme as reported by Yao et al. [2004]. Briefly, 1 mg PCR product contained in 17 ml sterile deionized water was mixed with 0.2 ml of acetylated bovine serum albumin (10 mg/ml), 2 ml enzyme 10X buffer, and 0.5 ml of EcoRI enzyme (10 U/ml; Promega, Madison, WI). The mixture was incubated at 37°C for 2 hr and subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel that contained ethidium bromide. The HHV-7-specific digestion fragments were visualized as 126- and 60-bp bands.

Serological Assays

Samples were analyzed for the presence of HHV-6 and HHV-7 IgG antibodies using indirect immunofluorescence assays. Slides were prepared using Molt-3 lymphoblastoid cells infected with the HHV-6 variant, B strain Z29, and SupT-1 cells were infected with the SB HHV-7 viral strain [kindly provided by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA]. In parallel, slides of uninfected cells were prepared as negative controls. For IgG detection, samples were diluted geometrically in PBS from 1:10. Positive and negative control sera (also provided by the CDC) were included in each run. For the IgG isotype test, sera were diluted 1:20 and the reaction was stained using FITC-conjugated mouse monoclonal antibodies against human IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 (Sigma, St Louis, MO). A fluorescein-conjugated goat anti-rat IgG antibody was diluted 1:100. Optimal dilutions of monoclonal antibodies used were titrated against reference sera. The dependent variable for analysis of the data was transformed into a base 2 logarithms. The geometrical mean titer (GMT) of the antibodies was calculated and the results are expressed as antilogarithms.

Data Analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to compare the frequency distribution of antibody titers with a normal distribution. The antibody titers were transformed into base 2 logarithms and expressed as antilogarithms. Student's t-test, Pearson's correlation coefficient (PCC), and w^2 tests were performed. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

As shown in Table I, HHV-6 DNA was detected in 15% of the 40 saliva samples tested. In plasma samples

TABLE I. Detection of HHV-6 and HHV-7 DNA in Saliva and Plasma Samples

| | n | DNA | |
|-------|----|--------------|--------------------------|
| | | Saliva | Plasma |
| HHV-6 | 40 | 15% (6/40) | 0% (0/40) |
| HHV-7 | 40 | 100% (40/40) | 90% (36/40) ^a |

^a $P < 0.0001$, w^2 test.

from the same patients, no viral DNA was detected. In contrast, HHV-7 DNA was detected in 100% of the saliva samples and in 90% of the plasma samples. To confirm the HHV-7 PCR detection results, the specificity of HHV-7 amplification was tested by digesting the initial PCR product (186 bp) with EcoRI. All the PCR products were consistent with the predicted amplification of HHV-7. Figure 1 shows the PCR amplification of HHV-6 and HHV-7 in saliva and plasma samples.

Table II lists the concentration and isotype response of HHV-6 and HHV-7 antibodies detected. Specific HHV-6 and HHV-7 IgG1 was detected in all sera. Specific HHV-7 IgG3 was detected in 8/40 (20%) of sera. Specific HHV-6 IgG3, IgG2, and IgG4 were not detected. No statistically significant difference was found for the distribution of antibody titers in these samples versus the normal distribution of the data (Kolmogorov–Smirnov test, $P \geq 0.07$ and $P \geq 0.12$, for IgG HHV-6 and -7, respectively). Therefore, the results were processed using parametric methods. There was no correlation between the antibody titers determined for HHV-6 and HHV-7 (PCC 0.22, $P \geq 0.170$) and no significant difference was observed for each of the GMTs according to patients age or sex (data not shown). No significant associations were found between the detection of HHV-6 DNA in saliva samples and viral antibody titers ($P \geq 0.278$, $P \geq 0.531$, respectively, t-test). Furthermore, the median GMT HHV-6 antibody titer for subjects with HHV-6 detected in corresponding saliva samples was 89, whereas the median for subjects

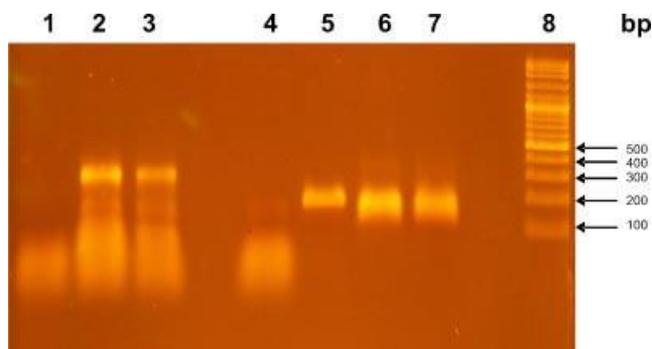


Fig. 1. Nested PCR amplification of HHV-6 and HHV-7 in saliva and plasma samples. Lane 1, HHV-6 negative control. Lane 2, HHV-6 positive control. Lane 3, HHV-6 amplified from a saliva sample. Lane 4, HHV-7 negative control. Lane 5, HHV-7 positive control. Lane 6, HHV-7 amplified from a saliva sample. Lane 7, HHV-7 amplified from a plasma sample. Lane 8, 100 bp molecular size ladder.

TABLE II. Concentration and IgG Subclasses of HHV-6 and HHV-7 Antibodies Detected in Sera Samples

| | n | GMT | 95% CI | IgG1 | IgG-specific isotypes | | |
|-------|----|-----|--------|--------------|-----------------------|-------------------------|-----------|
| | | | | | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
| HHV-6 | 40 | 104 | 79–136 | 100% (40/40) | 0% (0/40) | 0% (0/40) | 0% (0/40) |
| HHV-7 | 40 | 79 | 62–100 | 100% (40/40) | 0% (0/40) | 20% (8/40) ^a | 0% (0/40) |

^aP < 0.02, w² test.

without HHV-6 detection in corresponding saliva samples was 106 (P = 0.654, t-test). In contrast, the median GMT HHV-7 antibody titer for subjects with HHV-7 IgG3 was 104 (95% CI: 67–162), whereas for subjects without HHV-7 IgG3, their GMT was 68 (95% CI: 51–92) (P = 0.102, t-test).

DISCUSSION

The study of HHV-7-specific IgG subclasses has not been performed to date, and the unexpected presence of HHV-7-specific IgG3 antibodies in coincidence with the very high frequency of HHV-7 DNA detection in plasma is intriguing. In comparison with other reports, a study of Betaherpesviruses in blood donors has detected HHV-7 DNA in 10.6% of plasma samples assayed [Kozireva et al., 2001]. In contrast, Boutolleau et al. [2003] have reported a detection rate of 87% in peripheral blood mononuclear cells from healthy adults. For HHV-6, the detection profile was different because no viral DNA was detected in plasma samples. In previous studies, viral DNA detection rates in saliva specimens have been reported as 3–95% for HHV-6 and 55–97% for HHV-7 [Aberle et al., 1996; Kidd et al., 1996; Gautheret-Dejean et al., 1997]. In saliva specimens from healthy adults analyzed in the present study, HHV-6 and HHV-7 DNA was detected in 15% and 100% of samples, respectively. These results, in combination with detection of HHV-6 and HHV-7 in plasma samples, suggest that the HHV-7 DNA detection range is significantly greater in healthy individuals. It is generally accepted that the primary infection event of HHV-7 occurs usually between the ages of 2 and 5 years, which is later than the typical infection period for HHV-6 [Wyatt et al., 1991; Yoshikawa et al., 1993]. However, a recent seroepidemiological study conducted in Argentina has found that children are infected with HHV-7 earlier than with HHV-6 [Bustos et al., 2006]. This observation is consistent with the infection pattern described for other developing countries [Oliveira et al., 2003]. Given that saliva of previously infected individuals is predicted to be the major source of infection for infants, the higher levels of HHV-7 compared with HHV-6 detected in our saliva samples could explain the earlier infection by HHV-7 in children from Argentina.

The IgG subclass distribution of HSV, VZV, and HCMV antibodies has been studied at different stages of infection, and has been shown to involve predominantly IgG1 and IgG3 [Sundqvist et al., 1984; Doerr et al., 1987;

Joassin et al., 1989]. Nevertheless, in the present study, the HHV-6 IgG subclass was restricted to IgG1, whereas two HHV-7 IgG subclass patterns were observed, one that was restricted only to IgG1, and the other to IgG1 and IgG3. These differences in IgG subclass patterns are consistent with the differences in viral DNA detected in saliva versus plasma samples. The IgG3 subclass was the first to appear and to react with antigens from active HSV and VZV infections, therefore, it is hypothesized that the presence of IgG3 in sera from healthy individuals with HHV-7 DNA detected in plasma and saliva samples is caused by antigenic stimulation by active HHV-7 infection. Further investigation is needed to determine whether specific IgG3 in serum of healthy individuals can be a marker of HHV-7 active infection.

In summary, this paper shows a clear difference between DNA detection and IgG subclass patterns of HHV-6 and HHV-7 in healthy individuals. These data provide valuable insight into the biology and infection profile of these two Betaherpesviruses specifically in the Argentine population, particularly with regard to the potential of HHV-7 to be highly active in immunocompetent persons. Furthermore, this work emphasizes the need for continued research of Betaherpesviruses, especially HHV-7, in immunocompetent populations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Blood Bank of the National University of Cordoba for the collection of samples. This work was supported by grants from SeCyT, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; and SECYT, Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, Argentina. The authors have no conflicting interests.

REFERENCES

- Aberle SW, Mandl CW, Kunz C, Popow-Kraupp T. 1996. Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J Clin Microbiol* 34: 3223–3225.
- Achour A, Boutolleau D, Slim A, Agut H, Gautheret-Dejean A. 2007. Human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA in plasma reflects the presence of infected blood cells rather than circulating viral particles. *J Clin Virol* 38:280–285.
- Benito N, Moreno A, Pumarola T, Marcos MA. 2003. Human herpesvirus type 6 and type 7 in transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21:424–432.
- Berneman ZN, Ablashi DV, Li G, Eger-Fletcher M, Reitz MS, Jr., Hung CL, Brus I, Komaroff AL, Gallo RC. 1992. Human herpesvirus 7 is a T-lymphotropic virus and is related to, but significantly different from, human herpesvirus 6 and human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10552–10556.

- Boutolleau D, Fernandez C, André E, Imbert-Marcille BM, Milpied N, Agut H, Gautheret-Dejean A. 2003. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: Two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J Infect Dis* 187: 179–186.
- Broccolo F, Bossolasco S, Careddu AM, Tambussi G, Lazzarin A, Cinque P. 2002. Detection of DNA of lymphotropic herpesviruses in plasma of human immunodeficiency virus-infected patients: Frequency and clinical significance. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 1222–1228.
- Bustos D, Biganzoli P, Carricart SE, Ferreyra L, Nates SV, Pavan JV. 2006. Loss of maternally-derived human herpesvirus-7 immunity and natural infection in Argentinian infants. *Int J Infect Dis* 10: 354–357.
- Carricart SE, Bustos D, Biganzoli P, Nates SV, Pavan JV. 2004. Isotype immune response of IgG antibodies at the persistence and reactivation stages of human herpes virus 6 infection. *J Clin Virol* 31:266–269.
- Caselli E, Di Luca D. 2007. Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiol* 30:173–187.
- Chen T, Hudnall SD. 2006. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol* 19:726–737.
- Clark DA. 2002. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: Emerging pathogens in transplant patients. *Int J Hematol* 76:246–252.
- Doerr HW, Rentschler M, Scheifler G. 1987. Serologic detection of active infections with human herpes viruses (CMV, EBV, HSV, VZV): Diagnostic potential of IgA class and IgG subclass-specific antibodies. *Infection* 15:93–98.
- Ferreyra L, Bustos D, Biganzoli P, Isa MB, Don PS, Ribechini E, Nates SV, Pavan JV. 2010. HHV-6 IgG4 isotype response following measles infection. *J Med Virol* 82:396–399.
- Gautheret-Dejean A, Aubin JT, Poirer L, Huraux JM, Nicolas JC, Rozenbaum W, Agut H. 1997. Detection of human Betaherpesvirinae in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol* 35:1600–1603.
- Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Tanaka N, Nishikawa K, Ihira M, Yoshikawa T, Morishima T. 2002. Detection of herpesvirus DNA in the serum of immunocompetent children. *Microbiol Immunol* 46: 177–180.
- Isa MB, Martínez L, Giordano M, Zapata M, Passeggi C, De Wolff MC, Nates S. 2001. Measles virus-specific immunoglobulin G isotype immune response in early and late infections. *J Clin Microbiol* 39: 170–174.
- Jackson MA, Sommerauer JF. 2002. Human herpesviruses 6 and 7. *Pediatr Infect Dis J* 21:565–566.
- Joassin L, Somze A, Reginster M. 1989. Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of specific immunoglobulin G isotypes in primary and established cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 27:139–144.
- Katsafanas GC, Schirmer EC, Wyatt LS, Frenkel N. 1996. In vitro activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9788–9792.
- Kidd IM, Clark DA, Ait-Khaled M, Griffiths PD, Emery VC. 1996. Measurement of human herpesvirus 7 load in peripheral blood and saliva of healthy subjects by quantitative polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 174:396–401.
- Kozireva S, Nemceva G, Danilane I, Pavlova O, Blomberg J, Murovska M. 2001. Prevalence of blood-borne viral infections (cytomegalovirus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human herpesvirus-8, human T-cell lymphotropic virus-I/II, human retrovirus-5) among blood donors in Latvia. *Ann Hematol* 80:669–673.
- Krueger GR, Ablashi DV. 2003. Human herpesvirus-6: A short review of its biological behavior. *Intervirology* 46:257–269.
- Linde GA. 1985. Subclass distribution of rubella virus-specific immunoglobulin G. *J Clin Microbiol* 21:117–121.
- Oliveira SA, Turner DJ, Knowles W, Nascimento JP, Brown DW, Ward KN. 2003. Primary human herpesvirus-6 and -7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect* 131:873–879.
- Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vetenranta K. 2005. Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 45:820–825.
- Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, Benedetti L, Crowley RW, Komaroff AL, Gallo RC, Lusso P. 1995. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 171:273–280.
- Sundqvist VA, Linde A, Wahren B. 1984. Virus-specific immunoglobulin G subclasses in herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *J Clin Microbiol* 20:94–98.
- Ward K. 2005. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol* 32:183–193.
- Wyatt LS, Frenkel N. 1992. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol* 66:3206–3209.
- Wyatt LS, Rodriguez W, Balachandran N, Frenkel N. 1991. Human herpesvirus 7: Antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 65:6260–6265.
- Yang YY, Huang CF, Wei JC, Ho MS, Wang LN, Lin SJ, Tsai WY, Lin CC, Xu F, Yang CC. 2005. The study of IgG subclass profiles of anti-HBC in populations with different status of HBV infection. *Cell Mol Immunol* 2:393–398.
- Yao K, Dou J, Xu J, Sun H, Peng G, Ren Q, Ji X. 2004. Isolation of Nanjing local strains of HHV-7 and their biological and immunological characteristics. *Cell Mol Immunol* 1:367–372.
- Yoshikawa T, Asano Y, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, Suga S, Ozaki T, Wyatt LS, Frenkel N. 1993. Seroepidemiology of human herpesvirus 7 in healthy children and adults in Japan. *J Med Virol* 41:319–323.
- Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y. 1999. Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52:65–67.