

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



VIRUS HERPES HUMANO TIPO 6 Y ESCLEROSIS
MÚLTIPLE. APORTACIONES PATOGÉNICAS

MARÍA JOSÉ VERGARA PAVÓN

GRANADA, 2001

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María José Vergara Pavón
D.L.: GR. 2621-2009
ISBN: 978-84-692-3879-0

LOS PROFESORES D^a CARMEN MAROTO VELA, CATEDRÁTICA DE MICROBIOLOGÍA, D. JOSÉ GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, PROFESOR ASOCIADO DE MICROBIOLOGÍA, AMBOS PERTENECIENTES A LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, Y D. ÓSCAR FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, JEFE DEL SERVICIO DE NEUROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO CARLOS HAYA DE MÁLAGA

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta, al superior juicio del Tribunal que designe la Comisión del Doctorado a propuesta del Consejo del Departamento, D^a María José Vergara Pavón, titulada: **Virus Herpes Humano tipo 6 y esclerosis múltiple. Aportaciones patogénicas**, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación y optar al grado de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, a 24 de Enero de 2001.

Fdo. Carmen Maroto Vela José Gutiérrez Fernández Óscar Fernández Fernández

A la memoria de mi padre

Agradecimientos

A los Profs. **D^a. Carmen Maroto Vela, D. José Gutiérrez Fernández y D. Óscar Fernández Fernández**, directores de esta tesis, los cuales me han guiado en todo momento con sus conocimientos, dedicación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A la **Fundación Española de Esclerosis Múltiple**, sin cuyo soporte económico hubiera sido imposible llevar a cabo el trabajo experimental.

A **D^a. Patricia Morales**, que realizó el complejo trabajo estadístico empleando generosamente gran parte de su tiempo.

A **D. Miguel Guerrero**, que siempre nos prestó la ayuda necesaria para la realización de este trabajo.

A los Técnicos de laboratorio cuya cooperación fue imprescindible para la elaboración de este proyecto.

A los profesores, compañeros de residencia y personal del departamento de Microbiología de la Universidad de Granada que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

Al resto del personal del laboratorio, por las molestias que les he podido ocasionar.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
I. ANTECEDENTES	13
II. REVISIÓN CLÍNICA E HISTÓRICA	15
III. BIOLOGÍA GENERAL DEL VIRUS	18
1. Estructura y morfogénesis	18
2. Tropismo celular	20
3. Ciclo lítico de replicación	22
4. Efectos en las células	23
IV. BIOLOGÍA MOLECULAR	25
1. Estructura del genoma	25
<i>1.1. Variaciones entre cepas</i>	31
<i>1.2. Heterogeneidad intracepa</i>	32
<i>1.3. Relación de VHH-6 con otros virus herpes</i>	32
2. Replicación del ADN	34
3. Transcripción	36
4. Traducción	39
5. Activación transcripcional de VHH-6	41
6. Interacciones de VHH-6 y VIH-1 <i>in Vitro</i>	42
V. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN	44
VI. RESPUESTA INMUNE	49
VII. CONCEPTOS DE LATENCIA Y PERSISTENCIA	53
1. Respuesta inmune durante la latencia y persistencia	54
2. Detección en sangre	55
3. Presencia en saliva y glándulas salivares	56

4. Detección en LCR y cerebro	56
5. Aislamiento y detección a partir de muestras de biopsia renal	57
6. ADN de VHH-6 en pulmones	57
7. Presencia en el tracto genital	57
8. Identificación en células y tejidos neoplásicos	57
VIII. EPIDEMIOLOGÍA	59
1. Distribución por edades	59
2. Distribución geográfica de la infección	60
3. Variedades: VHH-6A y VHH-6B	62
4. Transmisión	62
IX. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	66
1. Infección primaria	66
<i>1.1. Niños</i>	66
<i>1.2. Adultos</i>	67
2. Enfermedad del sistema nervioso central	69
<i>2.1. Estudios in vitro e in vivo</i>	69
<i>2.2. Enfermedad aguda</i>	70
<i>2.3. Invasión del SNC en otras condiciones</i>	71
<i>2.4. Esclerosis múltiple</i>	71
3. Enfermedad en hospedadores inmunocomprometidos	104
<i>3.1. Trasplantes</i>	104
<i>3.2. Otros hospedadores sin VIH</i>	107
<i>3.3. Sida</i>	107
4. Neoplasias	109

4.1. Mecanismos moleculares	109
4.2. Asociaciones clínicas: desórdenes linfoproliferativos	110
4.2.1. Linfoma no Hodgkin	110
4.2.2. Enfermedad de Hodgkin	111
4.3. Asociaciones clínicas con otras neoplasias	113
4.3.1. Sarcoma de Kaposi	113
4.3.2. Carcinoma oral	114
4.3.3. Carcinoma cervical	114
4.4. Conclusiones del papel de VHH-6 en las neoplasias	115
5. Síndrome de fatiga crónica	115
6. Enfermedades del colágeno vascular	116
X. MODELOS ANIMALES	117
XI. DIAGNÓSTICO	119
1. Detección del virus: diagnóstico directo	119
1.1. Cultivo	119
1.2. Antígenos	120
1.3. Ácidos nucleicos	120
2. Diagnóstico serológico	122
3. Aplicación en el diagnóstico clínico	123
3.1. Enfermedad febril y rash	123
3.2. Enfermedad neurológica aguda	123
3.3. Otras	124
XII. TRATAMIENTO	125
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	132

MATERIAL Y MÉTODOS	137
I. MATERIAL	138
II. MÉTODOS	147
1. Investigación de los ácidos nucleicos de VHH-6	147
2. Investigación de anticuerpos anti-VHH-6, anti-CMV y anti-VEB	154
2.1. <i>IgG específica anti-VHH-6</i>	157
2.3. <i>IgG específica anti-CMV</i>	159
2.4. <i>IgG específica anti-VEB</i>	160
2.5. <i>IgA anti-CMV y anti-VEB</i>	161
3. Método estadístico	162
RESULTADOS	163
I. RESULTADOS GENERALES	164
1. Resultados en función de la forma clínica de EM	164
2. Resultados en función del sexo de los pacientes con EM	164
3. Resultados en función de la edad de los pacientes con EM	173
4. Resultados del seguimiento serológico de los pacientes con EM del grupo III	173
II. ESTADÍSTICA	181
1. Grupo general de enfermos con EM y controles con OEN	181
2. Grupo de seguimiento de enfermos con EM	183
3. Histogramas de resultados	183
3.1. <i>IgG de VHH-6 en suero</i>	183
3.2. <i>IgG de VHH-6 en LCR</i>	183
3.3. <i>IgM de VHH-6 en suero</i>	187
3.4. <i>IgM de VHH-6 en LCR</i>	187

<i>3.5. IgA de VHH-6 en suero</i>	187
<i>3.6. IgA de VHH-6 en LCR</i>	187
<i>3.7. IgG de CMV en suero</i>	190
<i>3.8. IgG de CMV en LCR</i>	190
<i>3.9. IgA de CMV en suero</i>	190
<i>3.10. IgA de CMV en LCR</i>	190
<i>3.11. IgG de VEB en suero</i>	194
<i>3.12. IgG de VEB en LCR</i>	194
<i>3.13. IgA de VEB en suero</i>	194
<i>3.14. IgA de VEB en LCR</i>	194
III. OTROS ESTUDIOS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL GRUPO I	197
1. Correlación entre los niveles de anticuerpos y la edad	197
2. Correlación entre los niveles de anticuerpos y el tiempo de evolución	197
3. Correlación entre los niveles de anticuerpos y la escala de discapacidad (EDSS)	197
4. Correlación entre los niveles de anticuerpos y el sexo	197
5. Correlación entre los niveles de anticuerpos y las formas clínicas de la enfermedad	198
IV. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO ENTRE LOS GRUPOS I Y III	199
V. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO ENTRE LOS GRUPOS II Y III	202
DISCUSIÓN	206
CONCLUSIONES	214
BIBLIOGRAFÍA	217

INTRODUCCIÓN

I. ANTECEDENTES

Los seres humanos son hospedadores primarios de las ocho especies de virus herpes (tabla 1). El virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1), el virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2), el virus de la varicela zóster (VVZ, virus herpes humano tipo 3 -VHH-3-), el virus de Epstein-Barr (VEB, virus humano tipo 4 -VHH-4-), el citomegalovirus (CMV, virus herpes humano tipo 5 -VHH-5-), el virus herpes humano tipo 7 (VHH-7) y el virus herpes humano tipo 8 (VHH-8) (Braun y cols., 1997).

La especie conocida como virus herpes humano tipo 6 (VHH-6) incluye a dos virus estrechamente relacionados, designados como VHH-6A y VHH-6B (variedades A y B, respectivamente). Un alto porcentaje de la población mayor de 2 años es seropositivo para una o ambas variedades. Mientras que VHH-6A aún no se ha relacionado con ninguna enfermedad humana de forma clara, VHH-6B es el agente etiológico del exantema súbito (ES), *roseola infantum* ó sexta enfermedad, así como de la enfermedad febril relacionada (tabla 1), y es frecuentemente activo en pacientes inmunocomprometidos de cualquier edad (Braun y cols., 1997).

Tabla 1. Perfil patogénico de los herpesvirus (Braun y cols., 1997).

Virus	Subfamilia	Edad de la primoinfección	% Prevalencia en adultos	Enfermedad en la primoinfección	Enfermedad en la reactivación	Enfermedad en la infección crónica	Enfermedad en pacientes ID	Células de la primoinfección	Células de latencia o persistencia
VHS-1	Alfa	Aprox. 20 años	~70	5/6 subclínica, 1/6 lesiones orales, infecciones neonatales	Lesiones orales, encefalitis	Mínima	Lesiones grandes que tardan en curar	Células epiteliales cutáneas	Neuronas de los ganglios trigéminos
VHS-2	Alfa	Después de actividad sexual	~30	5/6 subclínica, 1/6 lesiones genitales	Lesiones orales, encefalitis	Mínima	Lesiones grandes que tardan en curar	Células epiteliales cutáneas	Neuronas del ganglio sacro
VVZ	Alfa	Entre 6 meses y adolescencia	>95	Varicela	Herpes zoster	Mínima	Herpes zoster grave	Células epiteliales cutáneas	Células de los ganglios trigéminos y de las raíces dorsales
CMV	Beta	Aprox. 20 años	~70	5% de mononucleosis infecciosa, CMV congénito	?	Aterosclerosis (?), retinosis (?)	Enfermedad CMV, retinitis, enfermedad gastrointestinal	Células epiteliales de varios tejidos	Progenitores de granulocitos-macrófagos o monocitos (?)
VEB	Gamma	Aprox. 20 años	~85	>85% de mononucleosis infecciosa	?	Carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt	Linfomas de las células B, leucoplaquia oral	Células B del epitelio orofaríngeo	Células B
VHH-6A	Beta	?	>95% a las dos variedades	?	?	EM (?)	Infecciones diseminadas, neumonitis (?)	?	Piel, linfocitos
VHH-6B	Beta	Antes de 2 años		ES en 30% de niños				Linfocitos CD4+	Macrófagos, linfocitos
VHH-7	Beta	>50% hacia los 2 años	>85%	ES	?	?	Enfermedad CMV	Linfocitos CD4+	Virus infecciosos en saliva
VHH-8	Gamma	?	?	?	?	SK, enfermedad multicéntrica de Castleman, linfomas de efusión primarios	SK, enfermedad multicéntrica de Castleman, linfomas de derrame primarios	?	Esperma (?), linfocitos (?)

II. REVISIÓN CLÍNICA E HISTÓRICA

El descubrimiento de VHH-6A y VHH-6B se debe al desarrollo de métodos para el mantenimiento de los cultivos de linfocitos primarios y a la divulgación del uso de técnicas en el estudio de VIH. Salahuddin y cols. (1986) fueron los primeros en informar del aislamiento y caracterización de un nuevo herpesvirus en enfermos con sida y enfermedades linfoproliferativas, obtenido a partir de monocitos de sangre periférica (CMSP) estimulados con interleuquina-2 (IL-2) (Josephs y cols., 1986; Salahuddin y cols., 1992; Salahuddin y cols., 1986). En estos cultivos se mostró un efecto citopático inusual caracterizado por la presencia de células gigantes de apariencia globular. El virus se diferenció de los otros herpesvirus en sus propiedades de crecimiento, antigenicidad y contenido genético. Debido a su marcado tropismo por las células B, primero se denominó virus herpes humano B-linfotrópico (HBLV).

La existencia del nuevo virus se confirmó rápidamente por muchos laboratorios en diversos continentes, lo que muestra la extensión de la infección (Agut y cols., 1988; Becker y cols., 1988; Downing y cols., 1987; López y cols., 1988; Tedder y cols., 1987; Yamanishi y cols., 1988). Los resultados de muchos de estos laboratorios indicaron que el nuevo virus era más fácil de cultivar y de encontrar en linfocitos CD4+ (Becker y cols., 1988; Downing y cols., 1987; López y cols., 1988; Lusso y cols., 1988; Takahashi y cols., 1989; Tedder y cols., 1987), por lo que se cambió el nombre por el de VHH-6, una denominación independiente del tropismo celular y acorde con las directrices establecidas por el Comité Internacional de Taxonomía Vírica (Ablashi y cols., 1987).

Cuando se compararon las propiedades biológicas moleculares y celulares de los distintos aislamientos, se facilitó la separación en los dos grupos anteriormente mencionados. Estos grupos diferían con respecto a la epidemiología, propiedades de crecimiento, reactividad frente a anticuerpos monoclonales (mAbs), patrones de endonucleasa de restricción (ER) y secuencias de nucleótidos (Ablashi y cols., 1991; Aubin y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Bovenzi y cols., 1993; Chandran y cols., 1992; Dewhurst y cols., 1993; Frenkel y cols., 1994; Gompels y cols., 1992; Gompels y cols., 1995; Josephs y cols., 1988_b; Kadakia y cols., 1996; Pellett y cols., 1990; Schirmer y cols., 1991; Teo y cols., 1991; Wyatt y cols., 1990; Yalcin y cols., 1994_b; Yamamoto y cols., 1994). Después de un considerable debate, se tomó la decisión de reconocer formalmente que estas diferencias eran suficientes para separar los dos grupos del virus en variedades, aún compartiendo alrededor del 95% de sus genes (Ablashi y cols., 1992). Las cepas representativas de VHH-6A son GS y U1102, y las de VHH-6B, Z29 y HST.

La asociación de enfermedad con la infección por VHH-6 ha sido complicada debido a su elevada seroprevalencia, pero la temprana edad de adquisición de la infección sugiere que el virus puede relacionarse con una enfermedad pediátrica común. Yamanishi y cols. (1988) cultivaron VHH-6B a partir de muestras obtenidas durante la fase febril de niños con *roseola infantum* y encontraron que seroconvertían frente a VHH-6 dentro de las dos semanas siguientes a la enfermedad aguda. La infección primaria normalmente presenta un cuadro subclínico o benigno, pero también se han observado presentaciones más graves: hepatitis, síndrome hemofagocítico, infección diseminada fatal y manifestaciones neurológicas (convulsiones febriles y encefalitis).

No se ha obtenido ningún aislamiento de VHH-6A independiente de VHH-6B en niños con roseola u otras enfermedades febriles.

Además del estudio de la infección primaria en niños, VHH-6A y VHH-6B también se han propuesto como posibles cofactores de otras situaciones clínicas. Los herpesvirus son patógenos oportunistas comunes en individuos inmunocomprometidos, y se ha detectado actividad de VHH-6A y VHH-6B después de trasplantes de hígado, riñón y médula ósea. Los antígenos y ácidos nucleicos de VHH-6 están ampliamente extendidos en los tejidos de necropsia de pacientes con sida. Los fragmentos de ADN de VHH-6 pueden transformar *in vitro* a ciertas células en un fenotipo oncógeno, y es posible que el virus juegue un papel etiológico en la enfermedad de Hodgkin y otros tumores.

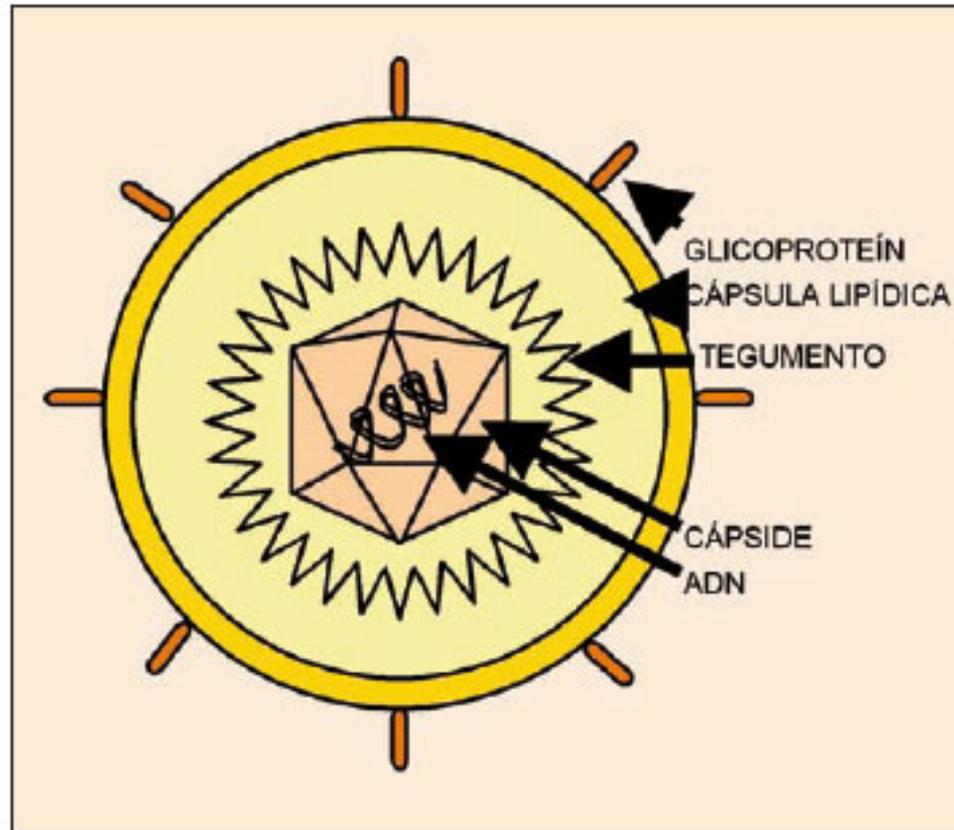
Un aspecto infravalorado de la biología de VHH-6 es su presencia como comensal del tejido cerebral. Las implicaciones de esta observación no se conocen con exactitud. Muchos informes actuales indican que la actividad y la distribución de VHH-6 en el sistema nervioso central (SNC) están alteradas en los enfermos de esclerosis múltiple (EM) (Challoner y cols., 1995; Wilborn y cols., 1994_b).

III. BIOLOGÍA GENERAL DEL VIRUS

1. Estructura y Morfogénesis

Los viriones de VHH-6A y VHH-6B, como en el resto de los herpesvirus, presentan cuatro elementos estructurales fundamentales: un core denso a los electrones, una cápside de simetría icosaédrica, un tegumento (ocupando el espacio entre la cápside y la envoltura) y una envoltura externa en la que encuentran ancladas las glucoproteínas codificadas por el virus así como las proteínas integrales de membrana (figura 1) (Roizman y cols., 1996). El proceso de maduración de la partícula de VHH-6 comienza en el núcleo, donde se ensamblan los 162 capsómeros para formar las nucleocápsides, con un diámetro de 90 a 110 nm (Biberfeld y cols., 1987; Yoshida y cols., 1989). Después del ensamblaje de la cápside, el tegumento se adquiere mientras el virión aún está en el núcleo por una serie de pasos de envoltura y desenvoltura (Nii y cols., 1990; Yoshida y cols., 1989) en una nueva estructura, el tegusoma, que es un compartimiento esférico rodeado de membrana de origen citoplasmático presente en el núcleo de células infectadas por VHH-6 (Roffman y cols., 1990). Las cápsides totalmente recubiertas con el tegumento, con un diámetro aproximado de 165 nm, se liberan al citoplasma por fusión del tegusoma con la membrana nuclear (Roffman y cols., 1990; Yoshida y cols., 1989). La morfogénesis de VHH-6 tiene lugar por acumulación citoplasmática de cápsides completas con un tegumento bien delimitado. Estas cápsides adquieren su envoltura por migración dentro de vesículas citoplasmáticas, produciendo viriones maduros de aproximadamente 200 nm de diámetro (Biberfeld y cols., 1987; Yoshida y cols., 1989) que son liberados por exocitosis (Roffman y cols., 1990).

Figura 1. Estructura del virión del VHH-6.



2. Tropismo celular

In vitro, VHH-6A y VHH-6B se replican más eficazmente en células T primarias activadas, pero también son susceptibles las células NK (natural killer) CD4-CD3+CD8+ y CD4-CD3- (Lusso y cols., 1993; Lusso y cols., 1995), y muchos aislamientos se han adaptado eficazmente a líneas continuas de células T CD4+ (HSB-2, SupT1, Molt3, J Jhan, MT-4, ET62). La cepa GS (VHH-6A) se propaga mejor en líneas celulares T HSB-2, y la cepa U1102 (VHH-6A), en células J JHAN. La cepa Z29 (VHH-6B) crece mejor en linfocitos primarios y se ha adaptado a la línea de células T Molt-3. Las cepas de VHH-6A generalmente no se replican en las células Molt3, mientras que las de VHH-6B no lo hacen en las células HBS-2. Otro linaje permisivo lo constituye la línea celular hepática HepG2 (Cermelli y cols., 1996), y existen numerosas líneas celulares humanas y no humanas que soportan el crecimiento del virus con una productividad muy baja (líneas de células cervicales, astrocitos primarios humanos, neuroblastoma, monocitos derivados del intestino humano, megacariocitos endoteliales, células del epitelio pulmonar de visón NBL-7 y CMSP de diversas especies de macacos) (Levy y cols., 1990, Ablashi y cols., 1989, Albright y cols., 1998). Resumiendo, mientras que las células T se usan más para la propagación de VHH-6A y VHH-6B, las líneas celulares de origen neurológico, epitelial y fibroblástico tienen distintos niveles de permisividad para el crecimiento de VHH-6 (Ablashi y cols., 1987; Cermelli y cols., 1996; Chen y cols., 1994; He y cols., 1996; Luka y cols., 1990), aunque ninguna de ellas es de uso común en la propagación rutinaria de los virus. Con algunas excepciones, los procedimientos de aislamiento vírico se han realizado

mediante cultivo de CMSP o cocultivo con CMSP primarios de adulto o linfocitos de sangre de cordón umbilical.

In vivo, el rango de tejidos hospedadores es más amplio que *in vitro*. Incluye ganglios linfáticos (Levine y cols., 1992_d), linfocitos (Cone y cols., 1993_a; Cuende y cols., 1994; Jarrett y cols., 1990), macrófagos y monocitos (Kondo y cols., 1991), células renales del endotelio tubular (Okuno y cols., 1990_b), glándulas salivares (Fox y cols., 1990; Krueger y cols., 1990; Ranger-Rogez y cols., 1995) y tejidos del SNC, en los cuales los productos del genoma vírico se han detectado en neuronas y oligodendrocitos (Challoner y cols., 1995, Luppi y cols., 1994; Luppi y cols., 1995).

Takahashi y cols. (1989) clasificaron los linfocitos obtenidos a partir de niños que presentaban episodios de ES durante las infecciones primarias (probablemente por VHH-6B) y observaron que los virus se recuperaban mejor a partir de poblaciones de linfocitos T CD4+. Cuatro semanas después de la infección primaria, el virus sólo se recuperaba de los macrófagos (Kondo y cols., 1991), lo que sugiere que estas células son los restauradores potenciales durante la infección latente.

Mediante tinción inmunohistoquímica (IHQ) se ha detectado infección activa por VHH-6 en varias células (células CD68+ del linaje monocito/macrófago en el sarcoma de Kaposi (Kempf y cols., 1997), células epiteliales y macrófagos pulmonares, dendrocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos y linfocitos infiltrantes de órganos de pacientes que murieron de sida, células epiteliales tubulares renales) y en glándulas submaxilares. También se han detectado secuencias de ADN de VHH-6 en numerosos órganos (piel, bazo, pulmón, corazón, riñón, glándula adrenal, esófago, duodeno, colon, hígado y células progenitoras de la médula ósea) a partir de pacientes que murieron

accidentalmente o de infarto de miocardio (Clark y cols., 1996; Di Luca y cols., 1996; Luppi y cols., 1999). Ya que en muchos de estos estudios la detección se realizó mediante PCR, no se ha diferenciado si las infecciones eran activas, latentes o persistentes, ni tampoco se ha definido la naturaleza de las células infectadas. Las cepas de la variedad B se encuentran más frecuentemente en los CMSP y en los tejidos sólidos. Las de la variedad A aparecen de forma predominante en la piel, y su capacidad de replicación en cultivos de fibroblastos primarios sugiere un especial tropismo por este tejido (Di Luca y cols., 1996). Además, se sabe que VHH-6 es un comensal del tejido cerebral.

3. Ciclo lítico de replicación

Existen muchas lagunas en el conocimiento de los ciclos de replicación de VHH-6A y VHH-6B, ya que no se ha identificado un receptor específico o célula diana. Parece ser que CD46 puede desempeñar este papel (Santoro y cols., 1999). Aunque ambos presentan especial tropismo por las células T CD4+, éste no parece ser el receptor. Además, la replicación de VHH-6A no se inhibe por CD4 soluble o por anticuerpos frente a CD4, bajo las mismas condiciones en que se inhibe la replicación de VIH-1 (Okuna y cols., 1990). La expresión de CD4 en células que normalmente no lo expresan no hace susceptibles a éstas a la infección por VHH-6B (Braun y cols. 1997).

La ruta de entrada a la célula y el mecanismo de migración de la cápside al núcleo son eventos desconocidos, no así los mecanismos de desempaquetamiento del ADN y su transporte al núcleo celular. Dentro de las 24 horas después de la infección con VHH-6B, la tasa de síntesis de proteínas celulares se incrementa (Balachandran y cols.,

1991; Black y cols., 1992_b; Di Luca y cols., 1990), y a las 65 horas de la infección, la síntesis de ADN celular se detiene y la síntesis de ADN vírico se inicia (Di Luca y cols., 1990). El virus de nueva replicación se detecta a las 72 horas de la infección (Black y cols., 1989).

4. Efectos en las células

Los virus herpes pueden tener profundos efectos sobre el metabolismo celular. Se han estudiado diferentes aspectos de la interacción virus-célula, más para VHH-6A que para VHH-6B.

Mediante proteínas marcadas con radiactividad se observó que VHH-6A no detiene la síntesis de proteínas celulares (Balachandran y cols., 1989). La infección de células mononucleares incrementa la expresión de interferón alfa (IFN- α) (Kikuta y cols., 1990), CD4 (Lusso y cols., 1991; Lusso y cols., 1993), interleuquina-1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), pero no de interleuquina-6 (IL-6) (Flamand y cols., 1991). La inducción de CD4 proporciona nuevos linfocitos susceptibles a la infección por VIH-1 (Lusso y cols., 1991), lo cual puede tener implicaciones patogénicas.

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, VHH-6B detiene la síntesis de ADN de la célula hospedadora después de las 65 horas del inicio de la infección (Di Luca y cols., 1990). En paralelo existe una amplia estimulación de la síntesis proteica celular simultáneamente al cese casi total de la síntesis proteica en linfocitos primarios sin infectar (Black y cols., 1992_b). A los 3 ó 5 días de la infección, los perfiles proteicos de las células infectadas son similares a los que muestran las células sin infectar

inmediatamente después de la estimulación con fitohemaglutinina, pero con un mayor nivel de síntesis en las células infectadas. El efecto red es la continuación de la síntesis proteica a niveles mayores que los observados en linfocitos estimulados, acompañada de inhibición de la división celular. Parece ser que el virus ha interrumpido un componente del ciclo celular que conecta el crecimiento citoplasmático con la división celular. Este desacoplamiento entre el crecimiento y la división celular lleva a la producción de células refractarias y grandes de aspecto globular en los cultivos celulares infectados por VHH-6.

IV. BIOLOGÍA MOLECULAR

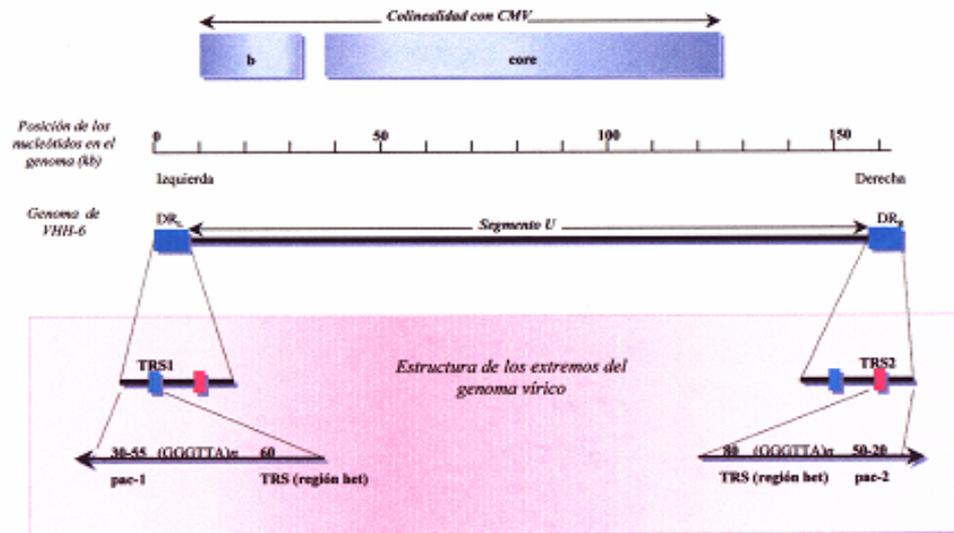
1. Estructura del genoma

La estructura del genoma (figura 2) la comparten VHH-6A, VHH-6B y VHH-7 (Domínguez y cols., 1996; Lindquester y cols., 1991; Martin y cols., 1991_b; Ruvolo y cols., 1996) y es específica dentro de la familia *Herpesviridae* (Chousterman y cols., 1979). El genoma de VHH-6 se compone de una molécula de ADN lineal de doble hebra de 162 a 170 kb, la cual contiene un solo segmento largo de 143 kb (segmento U) acompañado por zonas finales repetidas (DR), DR_L (izquierda) y DR_R (derecha), cuya longitud puede variar desde 8 a 13 kb después del cultivo del virus (Gompels y cols., 1995; Lindquester y cols., 1991; Martin y cols., 1991_b, Neipel y cols.; 1991, Thomson y cols., 1991_b). Se ha determinado la secuencia genómica completa de VHH-6A (cepa U1102): el segmento U es de 143147 pb y cada DR se compone de 8087 pb (Gompels y cols., 1995), con una longitud total de 159321 pb, ya que los DR presentes en el virus secuenciado son probablemente más cortos que los del virus silvestre del que provienen (Pellett y cols., 1990).

El contenido de G+C no es constante a través del genoma: del 41% en el segmento U y del 58% en los DR (Gompels y cols., 1995; Lindquester y cols., 1991; Thomson y cols., 1994), con un valor medio del 43%. Nunca se ha observado un contenido de G+C tan elevado en otros virus herpes secuenciados (Albrecht y cols., 1992).

El genoma de VHH-6 contiene reiteraciones del hexanucleótido (GGGTTA)*n* cerca del extremo de los DR (Gompels y cols., 1995; Kishi y cols., 1988; Lindquester y

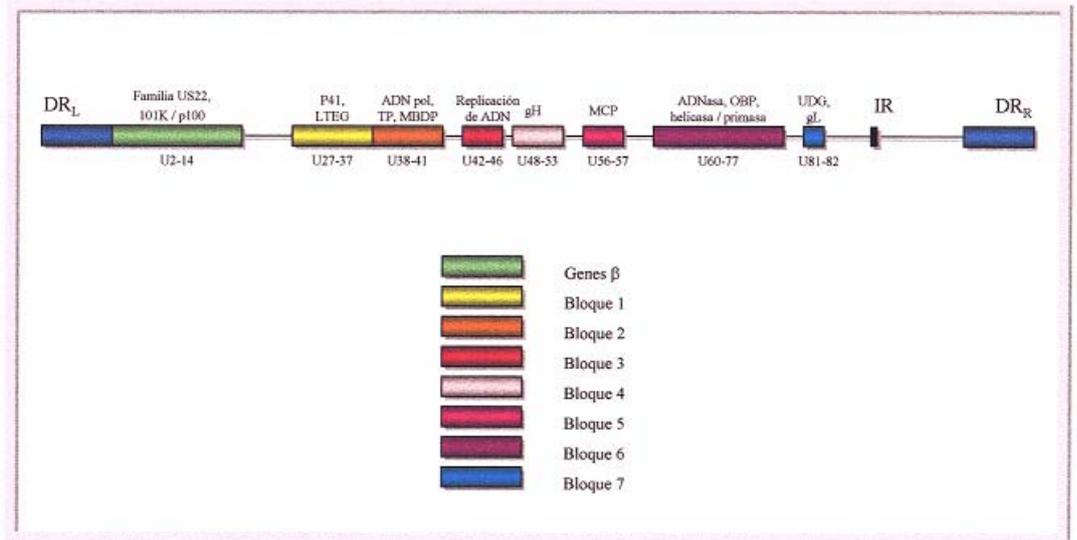
Figura 2. Estructura del genoma.



cols., 1996; Thomson y cols., 1994), que también se encuentran en los términos de VHH-7 (Secchiero y cols., 1995_b). Aunque este hexanucleótido está presente en las dos variedades, el contexto de las secuencias reiteradas difiere entre ambas, puesto que VHH-6A contiene secuencias repetidas adicionales que no se encuentran en VHH-6B (Thomson y cols., 1994). Esta secuencia puede adquirirse a partir de la célula hospedadora si está presente en los telómeros de sus cromosomas (Meyne y cols., 1989). La función de $(GGGTTA)_n$ no se conoce, pero existe la hipótesis de que interviene en la replicación del ADN y en el mantenimiento del cromosoma vírico como un episoma auto-replicante en las células infectadas de forma latente (Gompels y cols., 1993; Horvat y cols., 1993; Thomson y cols., 1994). Como $(GGGTTA)_n$ está localizado cerca pero no en los extremos del genoma, parece poco probable que esta formación esté involucrada en proteger la integridad de éstos durante la replicación del ADN (Thomson y cols., 1994), aunque sí es probable que dé lugar a una conformación favorable para la escisión de las moléculas de ADN.

VHH-6A y VHH-6B comparten con los otros virus herpes *beta* (CMV y VHH-7) semejanzas en cuanto a la estructura primaria de las proteínas así como en toda la organización del genoma (Domínguez y cols., 1996; Efstathiou y cols., 1992; Irving y cols., 1990_a; Lawrence y cols., 1990; Nicholas y cols., 1994; Nicholas y cols., 1996). Los virus herpes codifican una serie de genes conservados que están agrupados en siete bloques, cada uno compuesto de dos a ocho genes, tal y como se observa en la figura 3 (Chee y cols., 1990; Chou y cols., 1992_a; Chou y cols., 1992_b). Estos bloques presentan distinta localización, orden y orientación en el genoma según la subfamilia, aunque los genes dentro de un bloque mantienen el orden y la polaridad transcripcional. Los pro

Figura 3. Blques de genes conservados.



ductos de estos genes conservados incluyen componentes estructurales del virión, como la proteína principal de la cápside (MCP), la glucoproteína H (gH) y la proteína más grande del tegumento (LTEG). Otros son enzimas requeridos para la replicación del ADN y el metabolismo de los nucleótidos, como la proteína principal de unión al ADN (MDBP), la ADN polimerasa y la ADN-uracil glucosilasa (UDG). VHH-6 también codifica un bloque genético adicional, los genes *beta*, que sólo se han encontrado en CMV y están ausentes del resto de los genomas de virus herpes humanos (Gompels y cols., 1995; Nicholas y cols., 1994). Muchos de estos genes pertenecen a la familia de las proteínas US22, que se presentan en racimos diseminados a lo largo del genoma de CMV (Chee y cols., 1990). Los productos génicos de esta familia contienen una o más de tres secuencias conservadas de aminoácidos (Chee y cols., 1992) y los marcos de lectura abiertos (ORF) de esta familia genética también están presentes en VHH-7 (Domínguez y cols., 1996, Nicholas y cols., 1996). La función biológica de los productos de US22 permanece sin aclarar, aunque dos de sus genes en CMV, TRS1 e IRS1, pueden activar la transcripción de otros genes (Stasiak y cols., 1992).

El genoma de VHH-6A (cepa U1102) posee al menos 102 ORF que codifican al menos una proteína (Gompels y cols., 1995). De ellos, 70 cuentan con un homólogo en CMV. Estos genes, que se extienden desde U2 a U86, se localizan en la región U del genoma y están organizados con el mismo orden y orientación que los genes de la región UL de CMV. En la tabla 2 se han listado los genes de VHH-6 para los que su función principal se ha asignado experimentalmente o por analogía con otros virus herpes.

Tabla 2. Funciones o proteínas derivadas de los principales genes de VHH-6 (Braun y cols., 1997).

U82	<i>Glucoproteína L (gL)</i>
U83	<i>Citoquina intercrina</i>
ORF de VHH-6	FUNCIÓN <i>Gen IE, transactivador del LTR de VIH</i>
U94	<i>Homólogo del gen gag del parvovirus regulador del LTR de VIH</i> <i>101, p30, proteína antigénica del virión</i>
DR2	<i>Transformación de las células NIH 3T3, transactivador del LTR de VIH</i> <i>Receptor asociado a la proteína G</i>
U16	<i>Gen IE, transactivador del LTR de VIH</i>
U27	<i>Factor de procesamiento de la polimerasa (PA), transactivador del LTR de VIH</i>
U28	<i>Subunidad grande de la ribonucleótido reductasa</i>
U29	<i>Ensamblaje de la cápside y maduración del ADN</i>
U31	<i>Proteína grande del tegumento (LTP)</i>
U38	<i>ADN polimerasa</i>
U39	<i>Glucoproteína B (gB)</i>
U40	<i>Transporte y ensamblaje de la cápside (TP)</i>
U41	<i>MDBP</i>
U43	<i>Complejo helicasa/primasa (HP)</i>
U48	<i>Glucoproteína H (gH)</i>
U51	<i>Receptor asociado a la proteína G</i>
U57	<i>Proteína principal de la cápside (MCP)</i>
U70	<i>Exonucleasa alcalina</i>
U72	<i>Glucoproteína M (gM)</i>
U73	<i>OBP</i>
U74	<i>Complejo helicasa/primasa (HP)</i>
U77	<i>Complejo helicasa/primasa (HP)</i>
U81	<i>ADN uracil glucosilasa</i>

1.1. Variaciones entre cepas

Los genomas de las dos variedades son colineales, se hibridan entre sí y presentan tamaño y composición idénticos (Lindquister y cols., 1991; Martin y cols., 1991_b). Sin embargo, existen suficientes diferencias secuenciales como para que VHH-6A y VHH-6B presenten perfiles de ER característicos, lo que permite su separación por patrones específicos de variedad (Ablashi y cols., 1991; Aubin y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Schirmer y cols., 1991). Las divergencias en la secuencia genómica entre VHH-6A y VHH-6B van del 1 al 5% en el centro del genoma, donde se localizan los genes conservados del *core* (Ablashi y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Gompels y cols., 1993). La ADN polimerasa, la glucoproteína B (gB), la fosfotransferasa y los genes de una muestra de VHH-6B presente en el cerebro de un paciente con EM coincidían con el 99,9% de los aminoácidos de la correspondiente secuencia de la cepa Z29 (Challoner y cols., 1995).

La heterogeneidad depende del gen que se analice. Por ejemplo, cuando se estudia la región 210 pb del gen U47, los viriones de VHH-6A difieren el 2%, mientras que en los de VHH-6B las secuencias son idénticas (Gompels y cols., 1993). La región precoz inmediata (Chou y cols., 1994; Yamamoto y cols., 1994) y el gen codificante de la proteína vírica altamente inmunorreactiva (Pellett y cols., 1993) difieren más del 25% y del 10% respectivamente, entre las cepas de las dos variedades. A parte de estos genes, los genomas de las distintas variedades presentan perfiles de ER muy similares, exhibiendo polimorfismo característico de las diferencias entre cepas.

1.2. Heterogeneidad intracepa

En VHH-6B (cepa Z29), la heterogeneidad se localiza en una región cerca del extremo izquierdo de ambos DR y se manifiesta por la pérdida de 3 ó 4 kb en cada uno después de sucesivos pases en cultivo celular (Lindquister y cols., 1991, Pellett y cols., 1990). Esta porción variable del genoma se conoce como región *het*; la variación entre otras cepas también se ha localizado en esta región (Frenkel y cols., 1994; Gompels y cols., 1995; Martin y cols., 1991_b; Thomson y cols., 1994). Las causas que conducen a dicha heterogeneidad no se han identificado, pero parece ser la consecuencia natural de la replicación vírica.

1.3. Relación de VHH-6 con otros virus herpes

Como anteriormente se indicó, VHH-6 se agrupó inicialmente como virus linfotropo o virus herpes *gamma*, debido a su capacidad de infectar linfocitos (Luka y cols., 1990; Salahuddin y cols., 1986). Pero los estudios de ADN indicaron que estaba más próximo a CMV, un virus herpes *beta*, que a VEB (Efstathiou y cols., 1988; Lawrence y cols., 1990) y se clasificó como miembro del género *Roseolovirus* de la subfamilia *Betaherpesvirinae*. Debido a que se secuenció el genoma de la cepa U1102 de VHH-6A se dispuso de un análisis completo de su código genético (Gompels y cols., 1995). El 67% de los genes de esta cepa presentan homólogos en CMV, si se considera la semejanza de aminoácidos o su posición. Aún así, VHH-6 está más cerca de VHH-7 que de CMV, debido a la reactividad serológica cruzada, la hibridación de sus ADN y la semejanza de sus secuencias de nucleótidos (Berneman y cols., 1992; Black y cols., 1992_b; Domínguez y cols., 1996; Foà-Tomasi y cols., 1994; Frenkel y cols., 1990_b; Nicholas y cols., 1996). Por ejemplo, la MPC de la cepa U1102 comparte el 61,3% de

los aminoácidos con la MPC de VHH-7 (Mukai y cols., 1995) y el 43,8% con CMV (Littler y cols., 1990, Teo y cols., 1991) y menos del 30% con la MPC de VEB, VVZ y VHS (Littler y cols., 1990). Esta relación es similar a la de otros virus herpes dentro de sus respectivas subfamilias. Por ejemplo, VHS-1 y VVZ comparten el 52% de los aminoácidos de sus respectivas MCP (MacGeoch y cols., 1988).

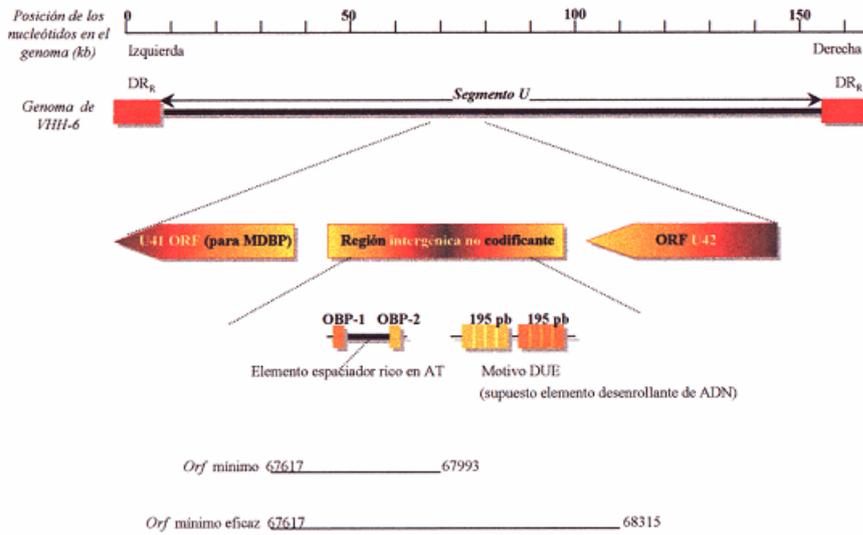
Se ha visto que algunos genes de VHH-6 no presentan homólogos en otros virus herpes. En la cepa U1102, existen 25 genes únicos tanto en la región DR como cerca de los extremos del segmento U; en algunas de estas regiones se produce corte y unión del ARN (Gompels y cols., 1995; Pfeiffer y cols. 1995). Dos de las regiones más estudiadas de los genes únicos de VHH-6 son los homólogos al gen *rep* del virus adeno-asociado de tipo 2 (*rep*_{AAV-2}), *rep*_{H6}, y el gen que codifica la glucoproteína gp82/105 (Pfeiffer y cols., 1993; Pfeiffer y cols., 1995; Thomson y cols., 1991_a). El homólogo *rep*_{AAV-2} se codifica en el ORF U94 de la cepa U1102 y tiene una localización genómica similar en VHH-6A y VHH-6B (Braun y cols., 1997). Su producto, Rep_{H6}, está más estrechamente relacionado con la proteína de *rep*_{AAV-2} (Rep_{AAV-2}) que con las proteínas homólogas de otros parvovirus (Thomson y cols., 1994). Su importancia radica en que VHH-7 carece de homólogo al gen *rep*_{AAV-2}, lo que pudiera ser un marcador de divergencia evolutiva entre VHH-6 y VHH-7 (Nicholas y cols., 1994). La proteína Rep_{AAV-2} es esencial para la replicación del ADN en AAV-2 y posee actividades de endonucleasa / helicasa dependiente de ATP específica de lugar (Im y cols., 1990). Se desconocen las funciones del gen *rep*_{H6} y su producto en el ciclo de vida de VHH-6. *In vitro*, se ha observado que proporciona una función auxiliar en la replicación del ADN (Thomson y cols., 1994), y además, *rep*_{H6} de la cepa U1102 puede completar la replicación de un genoma de AAV-2 deficiente en gen *rep*_{AAV-2} (Braun y cols. 1997).

La otra proteína característica de VHH-6 es la glucoproteína principal de la envoltura anteriormente mencionada, que consiste en numerosas poliproteínas relacionadas que se conocen colectivamente como complejo gp82/gp105 (Pfeiffer y cols., 1993). Las múltiples proteínas que componen gp82/gp105 se producen a partir del mismo gen como resultado de la unión diferencial entre 12 exones del ARN transcrito a partir del gen gp82/gp105 (Braun y cols. 1997; Pfeiffer y cols., 1995). Su papel es desconocido, pero parece ser importante en la biología de VHH-6, ya que existen epítomos neutralizantes. Los mAbs frente a esta proteína generados a partir de la cepa GS de VHH-6A son capaces de neutralizar la infectividad de VHH-6A, pero no la de VHH-6B (Pfeiffer y cols., 1993).

2. Replicación del ADN

VHH-6 codifica homólogos a las siete proteínas necesarias para la replicación lítica de VHS-1: MDPB, ADN polimerasa, una proteína asociada a la polimerasa, una proteína de unión al origen (OBP), así como el complejo helicasa / primasa compuesto por tres proteínas codificadas por los genes UL5, UL8, y UL52 de VHS-1 (Roizman y cols., 1996). VHH-6 parece codificar una secuencia homóloga a OBP de VHS-1 que sólo se había encontrado en virus herpes *alfa* (Gompels y cols., 1995; Inoue y cols., 1994; Lawrence y cols., 1995; Lindquister y cols., 1997_a; Nicholas y cols., 1994). VHH-6 tiene un origen para la replicación del ADN en la fase lítica (*oriLyt*, figura 4), que como en VHS-1, VVZ, y CMV, se localiza más arriba del gen que codifica el homólogo de MDPB (U41) (Anders y cols., 1992; Stow y cols., 1990; Weller y cols., 1990) y se compone de una región del segmento U de 1400 pb (sin capacidad aparente

Figura 4. Esquema del origen de replicación lítico (*ori*Lyt) de VHH-6 (Dewhurst y cols., 1997).



de codificar proteínas) que se localiza entre U41 y el gen homólogo a UL69 (VHS-1) y CMV/ICP27 (U42) (Dewhurst y cols., 1993; Lindquister y cols., 1997_b; Stamey y cols., 1995). Se identificó una región de aproximadamente 400 pb como la mínima región activa.

El *ori*Lyt de la cepa Z29 se localiza en la región genómica que incluye dos lugares de unión (OBP-1 y OBP-2) para OBP, los cuales se organizan por parejas simétricas, escoltados por espaciadores ricos en AT. Esta región contiene dos fragmentos de 195 pb (motivo DUE) que se cree que funcionan como elemento desenrollante del ADN (Dewhurst y cols., 1993), por lo que se ha visto que estos OBP se requieren para la replicación del ADN (Dewhurst y cols., 1994). Se ha demostrado que los OBP de la cepa Z29 no hibridan con los de VHS-1, y viceversa (Inoue y cols., 1994), ya que mediante ensayos de cambios en la movilidad por electroforesis competitiva (EMSA) se determinó que las secuencias para ambos OBP no eran complementarias (Inoue y cols., 1995).

3. Transcripción

Durante la infección lítica, los genes víricos se expresan con tres cinéticas. Los *alfa* o precoces inmediatos (IE) se transcriben sin requerimiento de síntesis de proteínas de *novo* y sus ARN_m se detectan frecuentemente en las tres horas siguientes a la infección. Las proteínas *alfa* frecuentemente regulan la expresión de otros genes. La segunda clase de genes, *beta* o tempranos (E), está involucrada en el metabolismo y en la replicación del ADN y su expresión es dependiente de la de los genes *alfa*. La tercera clase de genes es la *gamma* o tardíos (L) y sus productos están frecuentemente involucrados en el ensamblaje del virión y como componentes de la partícula vírica

madura (Roizman y cols., 1992). Por lo tanto, las proteínas pertenecientes a las dos primeras cinéticas presentan funciones enzimáticas fundamentalmente, y las producidas bajo condiciones *gamma*, funciones estructurales.

La regulación temporal de la expresión de los genes de VHH-6 no se conoce bien, aunque se han caracterizado muchas unidades de transcripción (Pellett y cols., 1993; Pfeiffer y cols., 1995; Schiewe y cols., 1994). La región más estudiada es la cercana al extremo derecho del segmento U en la cepa U1102 de VHH-6A, que comparte características con ciertas regiones codificantes IE de los virus *beta* (Martin y cols., 1991_a; Schiewe y cols., 1994). Estas características incluyen la supresión de la frecuencia del dinucleótido CpG, la codificación de activadores de la transcripción y la presencia de una compleja configuración de secuencias repetitivas que contienen lugares de unión a los factores de iniciación de la transcripción celular. Un *locus* IE de 5 kb proporciona dos ARN coterminales que tras la unión de sus exones presentan una longitud final de 3,5 y 4,7 kb cada uno, además de otros dos pequeños ARN transcritos a partir de la cadena complementaria. Las especies de 3,5 y 4,7 kb provienen de los ORF U89 y U90, respectivamente. Sólo el de 3,5 kb se detecta bajo condiciones *alfa*; el de 4,7 kb está presente en estadíos tardíos después de la infección y se inicia a partir de un promotor diferente localizado más arriba del elemento repetitivo R3 (Schiewe y cols., 1994). Los otros dos ARN cortos emergen del mismo promotor y no se expresan durante condiciones *alfa*. Otro posible IE localizado próximo a DR_L de VHH-6 es el fragmento génico B701 del ORF U16, estudiado en las cepas GS y U1102 de VHH-6A (Geng y cols., 1992; Nicholas y cols., 1994). Este gen es un miembro de la familia US22, es homólogo a UL36 de CMV y regula la expresión de otros genes (Coldberg-Poley y cols., 1992). *In vitro*, B701 puede activar la transcripción del promotor de VIH-

1, el cual podría funcionar como un activador de la expresión génica de VHH-6A (Geng y cols., 1992). Por otra parte, la transcripción del gen U11 codificante de la proteína 101K de la cepa Z29 de VHH-6B, proporciona un grupo de ARN_m de aproximadamente 2,6 kb de longitud, donde se detectaron dos extremos 5' y dos 3' (Pellett y cols., 1993). Estos ARN_m fueron más abundantes cuando se originaron por debajo de cada una de las dos cajas TATA localizadas 139 kb fuera de la región 5' de U11. De los dos extremos 3', el que contenía la señal de poliadenilación canónica (AATAAA) se traducía con más frecuencia. El significado de este hallazgo sugirió que esos ARN_m podrían regularse diferencialmente.

La unión de los exones de ARN puede ser un factor importante en la regulación de la transcripción de VHH-6. Como se describió para el *locus* IE, el gen que codifica a gp82/105 (Pfeiffer y cols., 1995) y el gen *rep*_{H6}, se transcriben en ARN que sufre corte y unión diferencial (Braun y cols., 1997), el cual se cree que desempeña un papel fundamental en la generación de varias clases de ARN_m para la traducción del complejo gp82/gp105 de VHH-6A y VHH-6B (Pfeiffer y cols., 1995).

Es importante destacar la intensa regulación de las cantidades de ARN que se transcribe. El ARN del gen *rep*_{H6} de la cepa Z29 de VHH-6B se expresa a niveles muy bajos en células Molt-3, máximo 10 copias por célula tres días después de la infección (Braun y cols., 1997). La razón de este fuerte control no se conoce, pero parece ser que la expresión excesiva de este gen puede retardar la biología de VHH-6.

Los promotores de la transcripción no se han caracterizado totalmente. El promotor génico de la ADN polimerasa de VHH-6A es TATA-deficiente, y el elemento regulador principal de la transcripción es un lugar de unión AFT/CREB (Agulnick y

cols., 1994). Un elemento de 21 pb, localizado 19 pb por encima de la caja TATA, es imprescindible para la expresión del gen U27 de VHH-6A que codifica el factor de procesamiento de la ADN polimerasa, PA (Thompson y cols., 1994), y contiene el factor de unión al lugar de transcripción, un DR de 6 pb y un repetido inverso (IR) de 5 pb superpuestos.

4. Traducción

Se han identificado 102 ORF con capacidad codificante en el genoma de la cepa U1102 de VHH-6A (Gompels y cols., 1995). La detección de proteínas específicas de VHH-6 es complicada ya que el virus no desactiva la síntesis proteica en la célula hospedadora (Balachandran y cols., 1989; Balachandran y cols., 1991; Black y cols., 1992_b), si no que al contrario, ésta se incrementa después de la infección. Parece que este efecto depende de la replicación del ADN vírico, ya que células infectadas con virus irradiados con rayos ultravioleta mostraron un descenso proporcional de su número, de la síntesis proteica celular, de proteínas y ADN vírico, efectos todos ellos directamente proporcionales al tiempo de exposición a la radiación. Además, las células infectadas en presencia de un inhibidor de la replicación de ADN vírico (como el ácido fosfonoacético) no incrementan la síntesis proteica celular (Black y cols., 1992_b).

Los polipéptidos presentes en las partículas de VHH-6 se caracterizaron mediante electroforesis. Se detectaron veintinueve polipéptidos desde 20 a 280 kDa con una banda más intensa de 180 kDa (Killington y cols., 1977; Shiraki y cols., 1989; Yamamoto y cols., 1990). Veintitrés de un total de 33 polipéptidos fueron identificados en otros virus herpes humanos (Roizman y cols., 1996). Cuando los viriones purificados se trataron con un detergente no iónico y se separaron en dos fracciones, de envoltura y

nucleocápside, el virión completo y las fracciones de nucleocápside se observó que contenían una banda principal de 143 kDa aproximadamente, que se correspondió con MCP de VHH-6 (Killington y cols., 1977; Shiraki y cols., 1989; Yamamoto y cols., 1990). La fracción de la envoltura reveló seis polipéptidos, entre los que se incluyen gB, gH, gL, gM y la glucoproteína gp82/105 que fueron identificados mediante secuenciación de los homólogos de la envoltura de otros virus herpes y por anticuerpos neutralizantes (Gompels y cols., 1995; Liu y cols., 1993; Pfeiffer y cols., 1993; Takeda y cols., 1996). En otros estudios se han identificado las proteínas de VHH-6 usando sueros humanos con títulos elevados de anticuerpos frente a dichas proteínas obtenidas por inmunoprecipitación a partir de células infectadas con la cepa GS de VHH-6A (Balachandran y cols., 1989; Balachandran y cols., 1991). Con este método se identificaron 20 polipéptidos de 180 a 36 kDa con una banda destacada de 135 kDa, que se encontró en todos los sueros estudiados.

La mayoría de los sueros humanos con anticuerpos específicos frente a VHH-6 reaccionan intensamente con la proteína de 101K (Yamamoto y cols., 1990), por lo que se considera un marcador de infección por VHH-6. La proteína homóloga de VHH-6A, p100, tiene un peso molecular de 100 kDa y, como 101K, es el principal constituyente de los viriones (Neipel y cols., 1992). Ambas proteínas se asemejan a pp150 de CMV en un tercio del extremo aminoterminal y comparten un 81% de su secuencia de aminoácidos (Pellett y cols., 1993). Por eso, esta proteína es excelente para el desarrollo de ensayos serológicos específicos de variedad.

En células infectadas por VHH-6A, como en todas las células infectadas por otros virus herpes, gH puede formar complejos con gL, y el complejo gH-gL se ha implicado

en la propagación del virus a otras células (Liu y cols., 1993). El dominio requerido para la interacción proteína-proteína entre gH y gL se localiza en el extremo amino terminal de gH, una región bien conservada entre los virus herpes *beta* (Anderson y cols., 1996). Estos complejos parecen tener una utilidad funcional poco específica, ya que los homólogos a estas glucoproteínas en CMV pueden sustituir a gH o gL en la formación de los mismos (Anderson y cols., 1996).

5. Activación transcripcional de VHH-6

Se ha observado que muchos genes y fragmentos clonados de ADN de VHH-6 pueden activar la expresión de los genes conectados al promotor LTR de VIH-1 (Di Luca y cols., 1991; Ensoli y cols., 1989; Horvat y cols., 1989). Esto puede ser biológicamente relevante porque VIH-1 y VHH-6 pueden infectar productivamente los mismos tipos de células y coinfectar linfocitos T CD4+ humanos (Carrigan y cols., 1990; Levy y cols., 1990_a; Lusso y cols., 1989). Estos genes son, entre otros, los ORF DR7, U16, U27 y U94 de la cepa U1102 de VHH-6A (Geng y cols., 1992; Kusuhara y cols., 1992; Martin y cols., 1991_a; Nicholas y cols., 1994; Thompson y cols., 1994; Thomson y cols., 1994; Zhou y cols., 1994), los fragmentos clonados pZVB70, pZVB10 y pZVH14 de la cepa GS de VHH-6A (Garzin-Demo y cols., 1996, Horvat y cols., 1991) y el fragmento *SalI* L de la cepa U1102 de VHH-6A (Kashanchi y cols., 1994, Thompson y cols., 1994). Las capacidades de activación fueron diferentes para las cepas GS y Z29 (Horvat y cols., 1991), ya que GS activa a dicho promotor en células T estimuladas y / o sin estimular, y Z29, sólo lo activa en células T previamente estimuladas. Uno de los genes más interesantes en este aspecto es U94, que codifica la proteína Rep_{H6}, la cual parece influir en la expresión génica de forma distinta a como lo

hace su homóloga Rep_{AAV-2}. Rep_{H6} de VHH-6A (cepa U1102) activa al promotor LTR de VIH-1 en líneas celulares de fibroblastos, pero no en células T, mientras que Rep_{AAV-2} inhibe la actividad de este promotor tanto en líneas de fibroblastos como de células T (Thomson y cols., 1994). La utilidad en el ciclo de vida de VHH-6 de la mayoría de los genes que actúan sobre LTR de VIH-1 no se conoce, aunque parece que tienen funciones generales a nivel de la transcripción.

Finalmente, la infección con VHH-6A (cepa GS) de las células previamente infectadas con VEB de forma latente puede activar la replicación lítica de este virus (Flamand y cols., 1993). Esta activación requiere viriones infecciosos y está mediada por un elemento dependiente del AMP-cíclico localizado dentro del promotor Zebra de VEB (Zp), que controla el producto del gen ZEBRA, responsable de interrumpir la latencia e iniciar la cascada de replicación lítica. El producto génico de VHH-6A responsable de activar a Zp no se localiza dentro de los fragmentos génicos que son capaces de activar al promotor LTR de VIH-1 (Flamand y cols., 1996).

6. Interacciones de VHH-6 y VIH-1 *in vitro*

Muchos de los primeros aislamientos de VHH-6 se obtuvieron de individuos infectados por el VIH-1. Esto, junto con el hecho de que ambos virus infectan de forma simultánea los linfocitos T CD4+, ha llevado a la conclusión de la existencia de una o varias interacciones específicas entre estos virus que pueden depender de que las mismas tengan lugar en células infectadas dualmente, de la probabilidad de infección simultánea, de que las interacciones específicas en el hospedador no requieran la presencia simultánea de los dos virus en la misma célula, de efectos no específicos de la

infección con un virus sobre la patobiología del otro y de la posibilidad de que las interacciones relevantes sólo se detecten *in vitro* (Braun y cols., 1997).

Como es sabido, VHH-6 puede activar *in vitro* la transcripción del promotor LTR de VIH-1, al igual que otros virus ADN (VHS-1 (Mosca y cols., 1987_a; Mosca y cols., 1987_b), CMV (Davis y cols., 1987), VEB (Kenney y cols., 1988), papovavirus (Gendelman y cols., 1986) y adenovirus (Nabel y cols., 1988)) por un mecanismo *tat*-independiente, pero las interacciones *in vivo* permanecen sin aclarar. VHH-6 y VIH-1 pueden coinfectar productivamente linfocitos T CD4+ humanos, observándose, *in vitro*, tanto efectos estimuladores como inhibidores. Por ejemplo, en coinfecciones de VIH-1 con la cepa GS se han encontrado linfocitos doblemente infectados, y también se ha observado una expresión génica de VIH-1 acelerada y un efecto citopático incrementado (Lusso y cols., 1989). En otros experimentos, la coinfección con cepas de VHH-6A suprimió la replicación de VIH-1, redujo los niveles de transcriptasa inversa así como la expresión de antígenos de VIH-1 (Carrigan y cols., 1990; Levy y cols., 1990_a; López y cols., 1988; Pietroboni y cols., 1988_b). Estos resultados indican que cada virus puede interactuar con el otro y que la dirección específica de la interacción puede depender de las condiciones experimentales concretas.

La forma en que la coinfección VHH-6 / VIH-1 de CMSP *in vitro* influye sobre VHH-6 se refleja en un posible incremento de la replicación del mismo (Carrigan y cols., 1990), ya que se ha observado que la expresión de la proteína Tat de VIH-1 puede inhibir tanto como estimular la replicación de VHH-6 (Di Luca y cols., 1991; Siczkowski y cols., 1995).

V. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

VHH-6A y VHH-6B son miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* (junto con CMV y VHH-7), dentro de la familia *Herpesviridae*, pertenecientes al género *Roseolovirus* (junto con VHH-7) y a la especie herpes humano tipo 6. Esta clasificación se debe al alto nivel de conservación secuencial y colinealidad genética entre estos virus y CMV, en comparación con el bajo nivel de semejanza que guardan con las subfamilias *alfa* y *gamma*.

Poco después del descubrimiento de VHH-6, muchos laboratorios describieron el aislamiento de virus que parecían ser cepas diferentes del mismo, ya que sus ADN hibridaron específicamente con un fragmento de ADN (digerido por *HindIII*) clónico de uno de los primeros aislados, hallándose distintos perfiles de ER. El significado de estas diferencias no era evidente. Se compararon las reactividades frente a los mAbs y el crecimiento en cultivos celulares de dos cepas previamente aisladas, Z29 (VHH-6B) y U1102 (VHH-6A), observándose comportamientos distintos entre ambas. Dado que sólo se compararon dos aislamientos, se concluyó que esas dos cepas en concreto diferían en esas propiedades (Becker y cols., 1989; Jarrett y cols., 1989; Kikuta y cols., 1989_a; Wyatt y cols., 1990).

En 1991 se agruparon las cepas en dos grupos, comparando todos los marcadores. Aubin y cols. (1991) compararon los perfiles de ER de grandes segmentos del genoma y las secuencias de nucleótidos de un segmento 163 de pb. Se encontraron dos grupos, tipificados como cepas SIE y HST. Las cepas incluidas en el grupo 1 se aislaron a partir de adultos inmunocomprometidos, y las del grupo 2, a partir de niños. Ablashi y cols. (1991) encontraron cepas que crecieron en HBS-2 y Sup T1 pero no en Molt-3, que

reaccionaban con todos los mAbs dirigidos frente a la cepa GS y que compartían patrones idénticos de ER, mientras que las cepas que no crecieron en HBS-2 y Sup T1, pero que sí lo hicieron en Molt-3, no reaccionaron con los mismos mAbs derivados de GS y compartían patrones idénticos de ER diferentes de los del otro grupo. Resumiendo, se propuso que los aislamientos de VHH-6 se separaran en dos grupos: VHH-6A (*GS-like*) y VHH-6B (*Z29-like*). Schirmer y cols. (1991) compararon todos los patrones de ER del genoma completo y la reactividad de todos los aislamientos de VHH-6 frente a un panel de mAbs. Los aislamientos que compartían el mismo patrón de ER que la cepa Z29 tenían una reactividad similar frente al panel de mAbs. Excepto la cepa Z29, que se obtuvo de pacientes con sida, los virus *Z29-like* se aislaron de enfermos con ES. Se consideró necesaria la reclasificación de cepas de VHH-6.

Hasta la fecha, se han estudiado los patrones de ER, el tropismo celular y la reactividad frente a paneles de mAbs de alrededor de 100 aislamientos de VHH-6 (obtenidos a partir de CMSP de niños con ES o síndromes febriles, saliva acelular de pacientes sanos o VIH y de CMSP de pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC) y de adultos) (Ablashi y cols., 1988; Ablashi y cols., 1991; Dewhurst y cols., 1992; Dewhurst y cols., 1993; Di Luca y cols., 1995_b; Harnett y cols., 1990; Kasatfanis y cols., 1996; Levy y cols., 1990_a; Schirmer y cols., 1991; Yamanishi y cols., 1988). Excepto para aislamientos que parecen ser mezclas de las dos variedades, todos han sido asignados sin ambigüedad a uno de los dos grupos.

Mientras que es clara la separación en dos grupos distintos, también es patente que los dos están estrechamente relacionados. Miembros de ambos grupos infectan células T CD4+ primarias. Aunque un subgrupo de los mAbs dirigidos frente a uno de

los miembros de un grupo no reaccionaba cruzadamente con los del otro grupo, muchos mAbs sí reaccionaron. La respuesta inmunitaria humana reacciona de forma cruzada entre grupos, y los anticuerpos policlonales de conejo (dirigidos frente a células infectadas con un miembro de un grupo ó frente a una proteína estructural purificada de un miembro de un grupo) también reaccionaron fuertemente con los miembros del otro grupo (Chandran y cols., 1992; Schirmer y cols., 1991). Los genomas se hibridaron de forma cruzada eficazmente (Lindquister y cols., 1996; Schirmer y cols., 1991). La identidad en la secuencia de nucleótidos está entre 75-97%, dependiendo del gen que se compare, con identidades que se acercan al 95% en la mayoría de los genes (Aubin y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Chou y cols., 1994; Clark, 2000; Gompels y cols., 1992; Gompels y cols., 1995; Lindquister y cols., 1997_b; Liu y cols., 1993; Pellett y cols., 1993; Yamamoto y cols., 1994). Además, ambos grupos codifican homólogos estrechamente relacionados con el gen *rep*_{AAV-2} en localizaciones genómicas equivalentes (Braun y cols., 1997; Thomson y cols., 1991_b). El virus herpes más estrechamente relacionado, VHH-7, no codifica dicho gen (Nicholas y cols., 1996).

La clara evidencia de dos grupos distintos pero estrechamente relacionados en los aislamientos de VHH-6 ha dado lugar a un dilema en su nomenclatura. Ablashi y cols. (1993) publicaron un informe en el que se describen las evidencias disponibles y se concluyó que los dos grupos deben reconocerse como variedades A (cepas GS- y U1102-*like*) y B (cepas Z29- y HST-*like*) de VHH-6. Se sugirió que era prematuro separar las variedades en dos especies distintas debido a su estrecha relación (mayor que la de cualquier otro par de especies conocidas de virus herpes) y a las lagunas en el conocimiento de la epidemiología de ambas variedades (Clark, 2000).

Según la definición propuesta por el Grupo de Estudio de Virus herpes del Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV) para las especies de virus herpes, se pueden considerar como especies distintas los virus relacionados cuyos genomas difieren de una forma realmente detectable y distintiva a lo largo de todo él (por ejemplo, patrones de ER distintos obtenidos con muchas enzimas) y no meramente en un sitio específico (por ejemplo, un pequeño número de genes o de lugares de ER) y si el virus ha demostrado tener distintas características biológicas y epidemiológicas (Roizman y cols., 1992).

En cuanto a la condición genética, se ha encontrado una secuencia de nucleótidos específica de cada variedad que presenta perfiles de fragmentos de ER marcadamente distintos. (Schirmer y cols., 1991). Esta variación secuencial es la fuente de la diferente reactividad frente a paneles de mAbs dirigidos contra una gran variedad de proteínas víricas. También se pensó que dado el alto grado de semejanza entre ambas variedades era posible la existencia de recombinación natural entre ellas, lo que indicaría solapamiento o nichos biológicos compartidos y la ausencia de evolución, como sucede con las variedades de VEB y las variaciones entre cepas de CMV. No se detectó evidencia de un gradiente genético entre los VHH-6A y VHH-6B, ya que todos los aislados que se han caracterizado para más de un marcador se han asignado sin ninguna ambigüedad a una u otra variedad, lo que apoyaría la separación en especies distintas.

Con respecto a las propiedades biológicas y epidemiológicas, la variedad VHH-6A se replica preferentemente en células Molt-3. Existe una estrecha asociación de las variedades de VHH-6B con el ES (Dewhurst y cols., 1992; Dewhurst y cols., 1993; Di Luca y cols., 1992; Pellett y cols., 1990; Schirmer y cols., 1991). Las dos variedades de VHH-6 se han encontrado simultáneamente en niños enfermos (Dewhurst y cols.,

1993). De las cepas de VHH-6 detectadas en trasplantes de médula ósea (TMO), 70 de 80 (87,5%) fueron de la variedad B, 6 (7,5%) fueron VHH-6A, y 4 (5%) fueron mezclas de ambas (Drobyski y cols., 1993_b, Frenkel y cols., 1994; Kadakia y cols., 1996; Secchiero y cols., 1995_a; Wang y cols., 1996; Wilborn y cols., 1994_c). Di Luca y cols. (1996) resumieron las diferencias biológicas específicas significativas entre variedades en función de la frecuencia de detección del ADN de VHH-6 en CMSP de donantes sanos, pacientes con sida y VIH positivos sanos, ganglios linfáticos de pacientes de diversas condiciones y en varios tejidos. En la mayoría de casos, la variedad B se detectó más frecuentemente, y VHH-6A fue detectado con más frecuencia en la piel sana, lesiones de sarcoma de Kaposi, líneas celulares derivadas de sarcoma de Kaposi y cultivos primarios de fibroblastos, lo que sugiere un especial tropismo de VHH-6A por la piel. Las distinciones entre variedades fueron menos marcadas en muestras de tejido pulmonar, donde 22 de 34 muestras (65%) dieron positiva la PCR para ambas variedades, 2 (6%) fueron positivas para la variedad VHH-6A y 10 (29%) para VHH-6B (Cone y cols., 1996). Concluyendo, aunque existe un solapamiento en la distribución tisular y la asociación con enfermedad, las diferencias específicas de variedad en el tropismo celular, en la asociación con enfermedad y en la distribución tisular parecen suficientes en su conjunto como para considerar su reclasificación en especies distintas (Clark, 2000).

VI. RESPUESTA INMUNE

Después del nacimiento, los anticuerpos específicos maternos protegen a los recién nacidos frente a la infección por VHH-6 durante los primeros meses de vida (Briggs y cols., 1988; Hall y cols., 1994; Huang y cols., 1992_b; Knowles y cols., 1988; Okuno y cols., 1989; Yoshikawa y cols., 1989; Yoshikawa y cols., 1990). Existen altos títulos de anticuerpos anti-VHH-6 en sangre materna de cordón umbilical (Yoshikawa y cols., 1989; Yoshikawa y cols., 1990). A la edad de 3-5 meses, la seroprevalencia y media geométrica del título de anticuerpos es mínima (Bapat y cols., 1989; Briggs y cols., 1988; Hall y cols., 1994; Knowles y cols., 1988; Okuno y cols., 1989; Yoshikawa y cols., 1989; Yoshikawa y cols., 1990). El incremento de la tasa de infección coincide con la desaparición de los anticuerpos maternos (entre 6-12 meses) (Hall y cols., 1994; Huang y cols., 1992_b). La viremia en la infección primaria induce a la aparición de anticuerpos neutralizantes (Asano y cols., 1989_b). Así, entre el 5° y el 7° día después de la aparición de los síntomas se detecta la IgM (Suga y cols., 1992), con títulos máximos entre la 2ª y la 3ª semana después de la infección, y desapareciendo después de dos meses. La IgG aparece entre el 7° y el 10° día después de la remisión de la fiebre (Balachandra y cols., 1991; Ueda y cols., 1989), va incrementando su avidez progresivamente (Ward y cols., 1993) y permanece detectable durante muchos años.

Existen situaciones especiales en las que se observa una alteración de la respuesta inmunológica. Así sucede en un número limitado de casos de pacientes con carcinoma oral avanzado, donde se produce un incremento de títulos de IgG específica frente a VHH-6 (Yadav y cols., 1994).

Se han estudiado poco las diferencias de títulos serológicos entre las variedades de VHH-6 (Yadav y cols., 1991; Chandran y cols., 1992). Puede deberse a reactividad sérica cruzada (polipéptidos comunes) ó diferentes respuestas de anticuerpos (polipéptidos únicos de variedad). La respuesta humoral en infectados por ambas variedades depende de la carga relativa de la infección (reactivada o primaria) con ambas variedades.

Se ha observado que los clones de células T *in vitro* presentan actividad frente a VHH-6 (Yasukawa y cols., 1993). En pacientes inmunodeprimidos, donde la respuesta inmune celular es insuficiente para controlar una infección primaria o una reactivación por VHH-6, se incrementa la viremia (Yamanishi y cols., 1988). Esto explica el consiguiente incremento en los títulos de anticuerpos frente a VHH-6 posteriormente a un trasplante renal (Merlino y cols., 1992; Okuno y cols., 1990_b; Yamanishi y cols., 1988), así como la recuperación de VHH-6 (cultivo) a partir de médula ósea, sangre, lavado broncoalveolar (LBA) o muestras de lavado oral (Carrigan y cols., 1991; Carrigan y cols., 1994; Drobyski y cols., 1993_b; Kadakia y cols., 1996; Wilborn y cols., 1994_c), los altos niveles de ADN vírico en TMO detectados por PCR (Cone y cols., 1993_b) y la diseminación extensa de VHH-6 por tejidos de pacientes con sida (Corbellino y cols., 1993; Knox y cols., 1994).

La inducción *in vitro* de la síntesis de IFN- α por exposición de CMSP y monocitos de sangre de cordón umbilical infectados con VHH-6 indica que esta citoquina puede ser importante en limitación de la infección *in vivo* por VHH-6 (Kikuta y cols., 1990). La radiación ultravioleta también induce la síntesis de IFN, por lo que no se requiere infección por VHH-6 para este efecto. El IFN- α exógeno también suprime la

replicación *in vitro* de VHH-6 (Kikuta y cols., 1990, Takahashi y cols., 1992). Otro efecto que se ha observado de la infección *in vitro* de CMSP por VHH-6 es el incremento de la citotoxicidad de los natural killer (NK). Se ha observado que los mAbs frente a IL-15 disminuyen este efecto (Flamand y cols., 1996) y que IL-15 reduce significativamente replicación vírica, lo que refleja la importancia de IL-15 en la activación de las defensas del hospedador. El incremento de la actividad NK y de los niveles de IFN- α circulantes, se produce durante infección primaria aguda *versus* convalecencia, lo cual indica un mayor control de la infección por VHH-6 debido a componentes específicos de la respuesta inmune (Takahashi y cols., 1992).

Por otro lado, se ha observado que VHH-6 es un virus inmunosupresivo ya que puede infectar linfocitos, macrófagos y NK. La infección de VHH-6A en clones de células T *in vitro* produce la disminución de la expresión de CD3 (Furukawa y cols., 1994; Lusso y cols., 1994). La primera teoría se apoya en que la expresión disminuida de CD3 requiere que tanto la replicación como la expresión del receptor $\alpha\beta$ de las células T también se reduzca. En los experimentos con la variedad B no se ha observado un efecto similar (Furukawa y cols., 1994). *In vitro*, VHH-6A y VHH-6B inhiben las respuestas linfoproliferativas de CMSP estimuladas con mitógenos (Flamand y cols., 1995; Horvat y cols., 1993). La infección con VHH-6A en CMSP ó en cultivos enriquecidos con células T suprime la síntesis de IL-2 tras estimulación mitógena (Flamand y cols., 1995). También se obtienen resultados similares en virus estimulados con radiaciones ultravioletas, ya los niveles de IL-2 se disminuyen con cultivos enriquecidos con células T o células Jurkat (Flamand y cols., 1995).

VHH-6A puede inducir la expresión de CD4 en linfocitos CD4-/CD8- (Furukawa y cols., 1994; Lusso y cols., 1991_a), linfocitos γ/δ (Lusso y cols., 1995) y NK (Lusso y cols., 1993), lo que facilitaría la entrada de VIH-1 a las subpoblaciones celulares inicialmente refractarias a la infección por el retrovirus.

En cuanto a la respuesta inmune frente a las numerosas infecciones concomitantes de VHH-6 con otros patógenos (CMV, VHS-1, VEB, dengue, adenovirus, coxsackie B, parvovirus B19, *Legionella pneumophila*, *Pneumocistis carinii* y posiblemente VHH-7) (Balachandra y cols., 1991; Chou y cols., 1990; Irving y cols., 1990_a; Knox y cols., 1995; Portolani y cols., 1993; Russler y cols., 1991; Suga y cols., 1990_b), se piensa que se produce un efecto inmunosupresor.

VII. CONCEPTOS DE LATENCIA Y PERSISTENCIA

De forma general, las infecciones víricas a nivel celular pueden ser líticas, latentes o abortivas. La progenie vírica infecciosa se produce durante la infección lítica, y las células hospedadoras normalmente mueren en este proceso. Durante la infección latente, la progenie infecciosa no se produce y la expresión de genes del virus se limita a aquellos que se requieren para el mantenimiento del estado latente. Las interacciones abortivas tienen lugar cuando la célula hospedadora permite la entrada del virus pero no puede sostener un ciclo lítico completo. De esta forma, las células infectadas de forma latente se pueden considerar infectadas de manera abortiva de forma que retienen al virus en espera de producir un ciclo lítico en respuesta a cambios en el medio celular. La infección persistente es la consecuencia de alcanzar el balance entre muerte celular por infección lítica y replicación celular.

Los términos de latencia y persistencia tienen otras interpretaciones desde el punto de vista clínico. Así, la latencia clínica es el periodo que media entre infección primaria y aparición de síntomas, o entre periodos de actividad vírica evidentes, y la persistencia clínica significa que el virus está residiendo en el hospedador, sin tener en cuenta el mecanismo celular de persistencia.

Todos los virus herpes humanos identificados hasta ahora, incluido VHH-6, pueden infectar a sus hospedadores de forma persistente después de la infección primaria. La infección vírica latente ocurre en lugares diversos como los ganglios trigéminos (VHS-1) y linfocitos B circulantes (VEB). La reactivación, con replicación lítica del virus, puede ocurrir en estos sitios, conduciendo hacia la enfermedad recurrente (Braun y cols., 1997).

1. Respuesta inmune durante latencia y persistencia

En la población adulta sana se ha detectado IgM en aproximadamente el 5% sin enfermedad reciente o concomitante, lo cual sugiere replicación subclínica de VHH-6 en personas previamente infectadas, aunque no se descarta reinfección por otras cepas del virus (Suga y cols., 1992).

Los incrementos significativos de IgG en pacientes inmunodeprimidos (trasplante renal alogénico) (Merlino y cols., 1992; Okuno y cols., 1990_b; Yoshikawa y cols., 1992_a), así como en poblaciones con ciertos desórdenes neoplásicos con respecto a controles sanos (Levine y cols., 1992_a; Levine y cols., 1992_b; Torelli y cols., 1991), sugiere la reactivación de VHH-6.

El 26% de niños monitorizados entre el 1^{er} y el 2^o año después de la infección primaria por VHH-6, cuadruplicaron al menos una vez sus títulos serológicos frente a VHH-6, lo que puede sugerir tanto reinfección con otras cepas (incluso con VHH-7) como reactivación de la infección por VHH-6 (Hall y cols., 1994).

Los incrementos en los títulos de anticuerpos frente a VHH-6 también se han detectado en individuos con infecciones primarias por otros virus herpes humanos. Los receptores de trasplante orgánico sólido presentaron incrementos en los títulos de anticuerpos anti-VHH-6 cuando se infectaron por CMV (Ward y cols., 1991) y anticuerpos de alta afinidad frente a VHH-6 durante la infección por CMV ó VEB (Ward y cols., 1991; Ward y cols., 1993). También se elevaron los títulos de anticuerpos anti-VHH-6 en un paciente con ES debido a VHH-7 después de una infección primaria con VHH-6 (Hidaka y cols., 1994; Torigoe y cols., 1995; Ueda y cols., 1994). La capacidad de VHH-7 para reactivar la replicación lítica de VHH-6B en linfocitos

activados se ha descrito en algunos experimentos (Katsafanas y cols., 1996), pero no se ha confirmado si este efecto justificaría el incremento observado en los títulos de anticuerpos anti-VHH-6 *in vivo*, ya que la reactividad cruzada entre VHH-6 y VHH-7 sería la explicación más aceptable (Hidaka y cols., 1994; Ueda y cols., 1994).

Detección en sangre

Las tasas de PCR positiva frente a VHH-6 en CMSP de donantes sanos van del 5% al 90% (Cone y cols., 1993_a; Cuende y cols., 1994; Fairfax y cols., 1994; Gautheret y cols., 1995; Gopal y cols., 1990; Jarrett y cols., 1990; Luppi y cols., 1995_a; Parris y cols., 1988; Wilborn y cols., 1991; Kondo y cols., 1991). Las diferencias observadas se deben probablemente a las cantidades de ADN presentes o a la técnica de extracción empleada, o a los diversos ensayos de PCR usados. A pesar de ello, los resultados obtenidos reflejan la existencia de infección persistente por VHH-6 en la población.

En un estudio de Hall y cols. (1994), el 7% de niños con infección aguda sufrieron cambios cualitativos (positivo / negativo / positivo) en los resultados de las PCR realizadas a partir de CMSP entre los 1-2 años que duró el periodo de seguimiento, lo cual sugirió tanto infección como reactivación. También se ha hallado ADN de VHH-6 (PCR) en linfocitos durante la infección primaria (Kondo y cols., 1991).

En un trabajo comparativo de los patrones de ER de ADN de VHH-6 antes y después de un TMO se argumentó más a favor de la infección persistente que de la reinfección, ya que dichos patrones fueron idénticos (Yoshikawa y cols., 1992_b).

Los estudios *in vitro* confirman los fenómenos previamente observados en la población. El tratamiento de los macrófagos con un mitógeno (13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol) conduce a la infección productiva en cultivo celular, consecuente

con reactivación o latencia. Además de la inducción química, se produce la replicación lítica de VHH-6B por cocultivo de CMSP primarios con células infectadas por VHH-7 (Kasatfanas y cols., 1996).

3. Presencia en saliva y glándulas salivares

A partir de la saliva se ha aislado VHH-6 (Black y cols., 1993; Levy y cols., 1990_b; Murray y cols., 1992) y su ADN (Cone y cols., 1993_a; Di Luca y cols., 1995_a; Tanaka-Taya y cols., 1996), así como de las glándulas salivares (Clark y cols., 2000; Ranger-Rogez, 1995) de personas sanas. Además se ha detectado (tinción IHQ e ISH) en secciones de glándulas salivares sanas (Fox y cols., 1990; Krueger y cols., 1990) y en áreas aparentemente sanas de glándulas que contienen tumores benignos (Fox y cols., 1990). Pero se ha cuestionado la especificidad de las sondas empleadas en algunos estudios que se realizaron antes del descubrimiento de VHH-7 y del reconocimiento de reactividad cruzada entre los VHH-6 y VHH-7 (Black y cols., 1993).

4. Detección en LCR y cerebro

Un elevado porcentaje de niños que han pasado infección por VHH-6 retienen ADN en su LCR, lo que sugiere que éste puede ser un reservorio para la infección persistente (Caserta y cols., 1994). El ADN de VHH-6 se ha detectado mediante PCR en alrededor del 80% de las muestras cerebrales de autopsia, lo que sugiere que el LCR de la mayoría de la población está persistentemente infectado por el virus (Challoner y cols., 1995; Luppi y cols., 1994_a; Luppi y cols., 1994_b; Luppi y cols., 1995_b).

También se han detectado antígenos víricos en astrocitos, macrófagos cerebrales y neuronas de la materia gris (Challoner y cols., 1995). Estos resultados también indican

una infección persistente del LCR por VHH-6 en la población mucho después de la primoinfección.

5. Aislamiento y detección a partir de muestras de biopsia renal

VHH-6 también se ha detectado en muestras intraoperatorias (Yoshikawa y cols., 1992_a) y en biopsias renales (Hoshino y cols., 1995; Yoshikawa y cols., 1992_a). Ya que los antígenos víricos fueron detectados en ausencia de viremia, estos resultados sugieren que los riñones pueden portar VHH-6 de forma persistente o latente.

6. ADN de VHH-6 en pulmones

Se ha encontrado ADN de VHH-6A y VHH-6B en muestras pulmonares (Cone y cols., 1993_b; Cone y cols., 1996), por lo que los pulmones pueden ser otro lugar para la infección latente o persistente de VHH-6 y los macrófagos alveolares, un reservorio.

7. Presencia en el tracto genital

El ADN de VHH-6 se ha detectado en la cérvix de mujeres embarazadas con más frecuencia que en las de las no embarazadas, por lo que se sugirió reactivación de la infección por VHH-6 del tracto genital durante el embarazo (Okuno y cols., 1995). Además, el ADN de VHH-6 se ha detectado en secreciones vaginales de mujeres tras la consulta en centros de enfermedades de transmisión sexual (Leach y cols., 1993).

8. Identificación en células y tejidos neoplásicos

El ADN y los antígenos de VHH-6 se han identificado en células y tejidos neoplásicos de un gran número de tumores que incluyen NHL (linfoma no Hodgkin) (Borisch y cols., 1991; Di Luca y cols., 1994; Fox y cols., 1993; Jarrett y cols., 1991; Josephs y cols., 1988_a; Luppi y cols., 1993_b; Yin y cols., 1993), HD (enfermedad de

Hodgkin) (Di Luca y cols., 1994; Krueger y cols., 1994; Torelli y cols., 1991), LLA-T (leucemia linfoblástica aguda de las células T) (Luka y cols., 1991), S100-CLPD (enfermedad linfoproliferativa crónica de las células T S100⁺) (Braun y cols., 1995), KS (sarcoma de Kaposi) (Bovenzi y cols., 1993; Kempf y cols 1994), carcinoma oral (Yadav y cols., 1994) y carcinoma cervical (Chen y cols., 1994). Aunque la relación etiológica de VHH-6 con estas condiciones es incierta, su aparición en personas mucho tiempo después de la primoinfección y la naturaleza crónica de la mayoría de estas enfermedades sugiere que VHH-6 puede infectar los tejidos neoplásicos de forma persistente o latente.

También se ha detectado el ADN de VHH-6 integrado en el *locus* cromosómico 17p13 de las CMSP de tres pacientes con EM, HD o NHL no relacionados con sida (Luppi y cols., 1993_a; Luppi y cols., 1994_c; Torelli y cols., 1995), sin determinar si este fenómeno es indicativo de latencia y / o de una potencial reactivación.

VIII. EPIDEMIOLOGÍA

Se han observado numerosos factores que pueden influir en las grandes diferencias de seroprevalencia de VHH-6 entre poblaciones. Estos incluyen la subjetividad en la interpretación de los ensayos de inmunofluorescencia (IFA), la falta de sensibilidad de algunos de los tests serológicos iniciales, las diferencias entre los ensayos, las cepas usadas como antígenos y la definición de los valores de puntos de corte usados como títulos negativos. Inicialmente, se describieron seroprevalencias que variaban desde el 3% hasta el 90%, se informaron tanto incrementos como descensos de la seropositividad relacionados con la edad y se encontraron o rechazaron correlaciones entre el estadio de anticuerpos frente a VHH-6 y la progresión a sida (Clark, 2000). Finalmente, según el área geográfica de que se trate, se puede afectar en la determinación de la edad de la primoinfección con VHH-6. A pesar de estas limitaciones, la información acumulada señala que la infección con VHH-6 tiene lugar de forma temprana en la vida en todas las poblaciones estudiadas (Braun y cols., 1997).

1. Distribución por edades

La infección por VHH-6 es muy común (aproximadamente 100% de seroprevalencia) y se adquiere a edad muy temprana. Los datos de seroprevalencia a los trece meses de edad varían entre 64-83% en países como Estados Unidos, Reino Unido, Japón y Taiwan (Briggs y cols., 1988; Brown y cols., 1988; Huang y cols., 1992_b; Knowles y cols., 1988; Okuno y cols., 1989; Yoshigawa y cols., 1989). Los títulos de anticuerpos son elevados en el recién nacido, caen entre los 3 y 9 meses de edad, se elevan poco después ligeramente y se mantienen hasta los 60 años o más. Este patrón indica que los recién nacidos portan anticuerpos maternos y que la primoinfección tiene

lugar frecuentemente durante el primer año de vida (Braun y cols., 1997). Los diversos estudios realizados muestran que las tasas de seroconversión son más elevadas entre 6 y 18 meses de edad (Hall y cols., 1994). (Huang y cols., 1992_b).

Por otro lado, gran número de investigadores han informado de un descenso de la seropositividad directamente proporcional con la edad entre los adultos (Brown y cols., 1988; Enders y cols., 1990; Levy y cols., 1990_b; Niederman y cols., 1988; Yanagi y cols., 1990), otros no han encontrado diferencias significativas (Briggs y cols., 1988; Okuno y cols., 1989) o incluso se han hallado incrementos después de los 62 años (Yamanishi y cols., 1992).

2. Distribución geográfica de la infección

La infección por VHH-6 está ampliamente distribuida por todo el mundo (Clark, 2000). Entre varias poblaciones, se han informado tanto de tasas de seroprevalencia bajas (20% entre las mujeres marroquíes embarazadas) (Ranger y cols., 1991) como de altas (100% entre adultos chinos asintomáticos) (Levy y cols., 1990_b). Entre 60-90% de las mujeres embarazadas en la África sub-Sahariana son seropositivas (Rangers y cols., 1991), mientras que la seroprevalencia varía del 39 al 80% entre las diversas etnias de Tanzania, Malasia, Tailandia y Brasil (Balachandra y cols., 1989; Buchbinder y cols., 1989; Essers y cols., 1991; Levine y cols., 1992_e; Linhares y cols., 1991; Yadav y cols., 1991). Informes de países industrializados, como Estados Unidos y Japón, han descrito tasas de seroprevalencia del 72 al 95% entre poblaciones que incluyen a niños y adultos (Brown y cols., 1988; Okuno y cols., 1989; Yanagi y cols., 1990).

Otros estudios han observado una seroprevalencia ligeramente mayor en mujeres que en hombres (Briggs y cols., 1988; Buchbinder y cols., 1989; Clark y cols., 1990;

Linhares y cols., 1991), mientras que otros no han observado diferencia alguna entre sexos (Saxinger y cols., 1988).

3. Variedades: VHH-6A y VHH-6B

El primer VHH-6 que se describió procedía de un enfermo de LLA de 17 años de edad y el aislado fue asignado a la cepa GS de VHH-6A (Ablashi y cols., 1995). Este virus, representativo de la variedad VHH-6A, fue inicialmente aislado en adultos (Ablashi y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Downing y cols., 1987), la mayoría de ellos, enfermos crónicos. Sin embargo, la mayor parte de los aislamientos en niños pertenecieron a la variedad VHH-6B, etiológicamente asociada a ES y a otros síndromes febriles de la infancia (Dewhurst y cols., 1993; Pellett y cols., 1990; Schirmer y cols., 1991). La variedad VHH-6B también ha sido detectada en numerosas enfermedades graves, mientras que la variedad VHH-6A no ha sido definitivamente asociada con ninguna enfermedad (Clark., 2000), aunque se ha aislado más frecuentemente en enfermos con KS (Bovenzi y cols., 1993), síndrome de fatiga crónica (SFC) (Di Luca y cols., 1995_b; Yalcin y cols., 1994_b) y también se asociado con sida (Knox y cols., 1996; Salahuddin y cols., 1986). Dewhurst y cols. (1993) consideraron los siguientes eventos como posibles causas de las diferencias epidemiológicas entre VHH-6A y VHH-6B:

(1) Los aislamientos de VHH-6A se hacen de enfermos inmunodeprimidos o con otras enfermedades crónicas no que pueden no ser representativos de la población general.

(2) Existen muchas diferencias entre ambas variedades con respecto a la latencia, reactivación y secuelas.

(3) La primoinfección por VHH-6A puede ser más tardía que por VHH-6B.

(4) La primoinfección por VHH-6A puede ser asintomática o causar enfermedad no febril.

4. Transmisión

Parece que la vía de transmisión es interpersonal, generalmente a través de la saliva de la madre al hijo. La transmisión transplacentaria es muy rara, pero puede contribuir a la seropositividad de algunos adultos (Adams y cols., 1998). Se observó la existencia de VHH-6 infecciosos en la saliva de casi toda la población estudiada (Harnett y cols., 1990; Levy y cols., 1990_b; Pietroboni y cols., 1988_a). Después del descubrimiento de VHH-7 y su identificación como comensal de la saliva humana (Black y cols., 1992_a; Wyatt y cols., 1992), se especuló que quizás los virus previamente identificados como VHH-6 en este hábitat pudieran ser en realidad VHH-7, debido a la reactividad cruzada de algunos reactivos empleados (Black y cols., 1993; Wyatt y cols., 1992). Posteriores análisis con reactivos específicos frente a VHH-6 y a VHH-7 (Harnett y cols., 1990; Pietroboni y cols., 1988_a) confirmaron la hipótesis (Harnett y cols., 1996). Sin embargo, se han obtenido muchos aislamientos de la variedad VHH-6B a partir de la saliva, con mucha menor frecuencia que VHH-7, sin identificarse ningún aislamiento de VHH-6A (Black y cols., 1992_a, Levy y cols., 1990_b, Mukai y cols., 1994). Además, se ha detectado ADN de VHH-6 en saliva por PCR con primers específicos frente a VHH-6 (Cone y cols., 1993_a; Di Luca y cols., 1995_a; Tanaka-Taya y cols., 1996), obteniéndose una gran variabilidad de resultados positivos, del 3 al 90 %

(Cone y cols., 1993_a; Di Luca y cols., 1995_a). Estos resultados concuerdan con la posibilidad de que las glándulas salivares sean un reservorio de infecciones víricas latentes o persistentes. Se ha observado que las tasas de detección varían con la edad, siendo máximas al año y decrecientes después (Tanaka-Taya y cols., 1996). También se ha observado que las cantidades de ADN detectadas en saliva varían ampliamente sin razón aparente, desde 100 (Jarrett y cols., 1990) a más de 50.000 (Cone y cols., 1993_a) copias de ADN por ml de saliva.

La protección frente a la infección de los anticuerpos maternos en las etapas iniciales de la vida no es infalible. En un estudio de Hall y cols. (1994) se indica que el 13% de los niños sufrieron la infección primaria antes de los 2 meses de edad, incluyendo uno de 14 días, detectándose niveles de anticuerpos significativamente menores que los niños que permanecieron sin infectar a edades similares. Esta observación sugiere la posibilidad de transmisión intrauterina o perinatal. Sin embargo, este mecanismo debe ser poco común, ya que la IgM específica frente a VHH-6 está ausente en el suero de los recién nacidos (Farr y cols., 1990), y presente en sólo 2 de 799 muestras de sangre de cordón umbilical (Dunne y cols., 1992).

La idea de transmisión intrauterina la soportan datos sobre la ausencia de ADN de VHH-6 en la faringe de los neonatos estudiados por PCR (Kido y cols., 1990) y la recuperación de ADN de VHH-6 a partir de los tejidos y secreciones cervicales de la madre (Aubin y cols., 1992; Di Luca y cols., 1996; Leach y cols., 1994; Okuno y cols., 1995). Se le ha atribuido a este mecanismo de transmisión las muertes de neonatos por hepatitis fulminante u otras causas debidas a VHH-6B (1995 Mendel y cols., 1995; Wiersbitzky y cols., 1993) y la encefalopatía residual en neonatos por VHH-6

(Wiersbitzky y cols., 1993). Muchos de estos datos se apoyan en el hecho de que los virus aislados a partir de la sangre obtenida de las madres y sus hijos presentaban secuencias idénticas, muy sugerente de transmisión pre- ó perinatal.

Sin embargo, la saliva es el vehículo de transmisión más común de madres a hijos. Existen muchos estudios que detectan el ADN del virus en la saliva de la madre y lo comparan con las secuencias presentes en la sangre de los hijos con ES (Mukai y cols., 1994; Suga y cols., 1995; Van Loon y cols., 1995). La transmisión de la infección también puede producirse niño a niño en los brotes de ES, como lo demuestra un trabajo realizado en un orfanato (Okuno y cols., 1991).

Existe un estudio serológico cuyos resultados sugieren la posibilidad de reinfección con diferentes cepas de VHH-6, dado el incremento significativo de los títulos de IgG preexistente y por la presencia de IgM específica tanto en la fase aguda como en la convaleciente. Pero estos fenómenos también pueden ser atribuidos a la reactivación de una infección previamente adquirida, o a la infección con otro virus herpes con reactividad cruzada con VHH-6 (VHH-7) (Kusuhara y cols., 1991). En un segundo trabajo se aclaran estas dudas, ya que se estudiaron a lo largo del tiempo las secuencias de ADN de VHH-6 presentes en CMSP y en la saliva de varios individuos, observándose variaciones en las mismas. Dada la estabilidad genética de estos virus, y descartado VHH-7, la reinfección con otras cepas de VHH-6 explica las variaciones del genoma de VHH-6 (Liu y cols., 1993).

También se ha sugerido la transmisión feco-oral de la infección por VHH-6 en niños tras la observación de su ADN (PCR), persistente o intermitentemente, en

muestras de heces durante más de cuatro meses después de un episodio de ES (Suga y cols., 1995).

Además, se ha considerado como vía de transmisión la alimentación con leche materna, durante y después del periodo perinatal, aunque no se ha detectado ADN de VHH-6 en este fluido (Dunne y cols., 1993), y la seroconversión frente a VHH-6 en estos niños y en aquellos alimentados con leches maternizadas se produce a la misma edad (Takahashi y cols., 1988).

La integración del genoma de VHH-6 en linfoblastos en un enfermo con leucemia y su descendencia abre la posibilidad de transmisión genética. Ya que no se ha observado transmisión vertical en otros casos de integración genómica, la presencia del ADN de VHH-6 en la descendencia se ha interpretado, de forma alternativa, como una tendencia del virus a integrarse en unos *loci* cromosómicos específicos (Daibata y cols., 1998; Luppi y cols., 1998).

Resumiendo, aunque la transmisión intrauterina o perinatal puede acontecer de forma esporádica, los datos epidemiológicos indican que la mayoría de las infecciones se producen después de estos periodos. La forma de transmisión más común es a través de la saliva de la madre al hijo, dada la demostración de VHH-6 en este fluido, así como el hallazgo de perfiles idénticos de fragmentos de ER y de productos de PCR entre parejas madre-hijo (Braun y cols., 1997).

IX. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1. Infección Primaria

1.1. Niños

En los años 50 se identificó que un agente infeccioso era el causante del ES, *roseola infantum* o sexta enfermedad, por la confirmación de transmisión inter-personal (Hellstrom y cols., 1951; Kempe y cols., 1950) y de persona a primate (Kempe y cols., 1950). En 1988 se identificó a VHH-6B como el agente infeccioso responsable de la mayoría de los casos de ES (Yamanishi y cols., 1988), al que también se le atribuyeron otras enfermedades relacionadas con la infancia (Dewhurst y cols., 1993; Hall y cols., 1994; Portolani y cols., 1993; Pruksananonda y cols., 1992, Schirmer y cols., 1991). Se han relacionado una minoría de casos de ES y de fiebre sin rash con primoinfecciones por VHH-7 (Tanaka y cols., 1994; Torigoe y cols., 1995), aunque esta infección parece más tardía que la de VHH-6B (Black y cols., 1996; Tanaka-Taya y cols., 1996; Wyatt y cols., 1991). Inicialmente se sugirió que las manifestaciones de la primoinfección por VHH-7 eran consecuencia de la reactivación de la infección de VHH-6 por parte de VHH-7. La evidencia de que VHH-7 causa por sí mismo una enfermedad exantemática (aunque con menor frecuencia que VHH-6B) se debe a que algunos niños con ES presentan anticuerpos frente a VHH-7 pero permanecen negativos a VHH-6B (Caserta y cols., 1998; Tanaka y cols., 1994).

Aunque la forma clásica del ES puede incluir manifestaciones como convulsiones febriles o fontanela prominente, normalmente no requiere tratamiento específico y se resuelve sin secuelas. En pacientes con periodos febriles prolongados se observa un mayor número de células sanguíneas infectadas (Okada y cols., 1993; Secchiero y cols.,

1995_a; Yamanishi y cols., 1988) dentro de los 3-4 días tras el comienzo de la fiebre; después del quinto día, la viremia se resuelve generalmente (Asano y cols., 1989_b; Asano y cols., 1991_a), lo que coincide con la aparición de anticuerpos neutralizantes (Asano y cols., 1989_b; Ueda y cols., 1989; Yoshiyama y cols., 1990).

Los primeros informes definieron infecciones primarias con fiebre sin rash (Suga y cols., 1989) y con rash sin fiebre (Asano y cols., 1989_a). Otras investigaciones (Black y cols., 1996; Hall y cols., 1994; Huang y cols., 1991; Portolani y cols., 1993; Prou y cols., 1989; Pruksananonda y cols., 1992; Segondy y cols., 1992; Tait y cols., 1996; Hanukoglu y cols., 1994; Kanegane y cols., 1995; Van Zeijl y cols., 1995; Wiersbitzky y cols., 1992; Yoshida y cols., 1995) han confirmado que muchas de las infecciones primarias por VHH-6B no cursan como ES clásico y pueden presentar complicaciones más graves: disfunción hepática (Tajiri y cols., 1990; Takikawa y cols., 1992), hepatoesplenomegalia (Huang y cols., 1991; Irving y cols., 1990_b), hepatitis fulminante fatal (Mendel y cols., 1995) y no fatal (Asano y cols., 1990_b; Mendel y cols., 1995), invaginación intestinal (Asano y cols., 1991_b), trombocitopenia (Huang y cols., 1991), púrpura trombopénica (Kitamura y cols., 1994; Saijo y cols., 1995_a; Saijo y cols., 1995_b; Yoshigawa y cols., 1993), síndrome hemofagocítico fatal (Chen y cols., 1995; Huang y cols., 1990) y no fatal (Chou y cols., 1992; Sugita y cols., 1995) y enfermedad diseminada mortal (Prezioso y cols., 1992).

1.2. Adultos

La infección primaria en adultos y niños mayores es rara y parece tener mayor gravedad que en la lactancia. En este tipo de infección, el virus se replica de forma activa en las glándulas salivares (Di Luca y cols., 1996; Harnett y cols., 1990; Levy y

cols., 1990_b), permanece latente en los linfocitos y monocitos (Kondo y cols., 1991), y persiste en varios tejidos. Es probable que existan lugares adicionales de latencia, ya que se puede detectar el virus o secuencias del mismo en muchos tejidos. Una forma de latencia vírica la representa la integración del genoma de VHH-6 en los cromosomas del hospedador (Daibata y cols., 1998; Luppi y cols., 1998). La fuente a partir de la cual el virus se extiende a los órganos aún permanece sin aclarar, ya que los monocitos sólo pueden ser meros vehículos en los que el virus es transportado al resto de los órganos al tener una vida media corta. Esta posible fuente puede estar constituida por glándulas salivares o células progenitoras de la médula ósea, infectadas *in vivo* de forma latente por el virus (Luppi y cols., 1999).

En estos pacientes se han descrito, de forma ocasional, síndrome mononucleósico con o sin eritrodermia (Akashi y cols., 1993; Goedhard y cols., 1995; Steeper y cols., 1990; Sumiyoshi y cols., 1994), síndrome mononucleósico con ictericia (Sumiyoshi y cols., 1994); linfadenopatía prolongada (Irving y cols., 1990_b; Niederman y cols., 1998), hepatitis fulminante (Sobue y cols., 1991) o infección generalizada (Campadelli-Fiume y cols., 1999). La histiocitosis del seno con linfadenopatía masiva (SHML) o enfermedad de Rosai-Dorfman es un desorden poco común que afecta a niños y adultos jóvenes (Foucar y cols., 1990; Rosai y cols., 1969; Rosai y cols., 1972), y algunos casos son debidos presumiblemente a una respuesta inmune anómala frente a la infección por VHH-6 (Levine y cols., 1992_d).

2. Enfermedad del sistema nervioso central

Como se ha indicado anteriormente, VHH-6 puede infectar *in vitro* a células de origen neurológico y tejidos del SNC *in vivo*. Esto sugiere, en primer lugar, su elevado neurotropismo, y en segundo lugar, que VHH-6 puede jugar un papel significativo en las enfermedades del cerebro y de la médula espinal (Braun y cols., 1997). Este virus se ha asociado con EM, ya que se ha detectado en los oligodendrocitos de las placas de desmielinización (Challoner y cols., 1995; Clark, 2000).

2.1. Estudios *in vitro* e *in vivo*

Mediante tinción inmunofluorescente se observó que el aislado gambiano AJ de VHH-6 forma sincitios en cultivo de líneas celulares embrionarias de la glía (HEB), (Tedder y cols., 1987). La cepa GS de VHH-6A infecta de forma abortiva la línea celular de glioblastoma HBT-14, con pérdida de células antígeno positivas a los 10 días de infección; las células infectadas se agrandan y se vuelven refráctiles. La cepa SF de VHH-6B crece persistentemente a bajos niveles en la línea celular de neuroblastoma SK-N-MC (Levy y cols., 1990_a). Los astrocitos fetales humanos primarios pueden ser infectados por ambas variedades en cultivo celular, con la formación de sincitios gigantes (He y cols., 1996). No se conoce la infección *in vitro* de oligodendrocitos o neuronas por VHH-6, aunque existe evidencia de infección de estos tipos celulares *in vivo*.

In vivo, se ha documentado la neuroinvasión en bebés con infección primaria, con encefalitis focal, en niños y adultos con sida, en receptores de trasplantes de médula ósea, así como en niños y adultos inmunocompetentes (Camapdelli-Fiume y cols., 1999).

2.2. Enfermedad aguda

Las descripciones de ES incluyen complicaciones como convulsiones febriles, hundimiento de la fontanela anterior, hemiplejía, meningoencefalitis y encefalopatía residual (Berenberg y cols., 1949; Burnstine y cols., 1959; Moller y cols., 1956; Yanagihara y cols., 1995). Junto con el reconocimiento de VHH-6B como el principal agente etiológico de ES, se le ha implicado en las manifestaciones centrales en la enfermedad aguda pediátrica (Asano y cols., 1991_a; Barone y cols., 1995; Hall y cols., 1994; Huang y cols., 1991; Ishiguro y cols., 1990; Jones y cols., 1994; Kishi y cols., 1988; Kondo y cols., 1993; Suga y cols., 1993; Yoshigawa y cols., 1992_c) o en las reactivaciones o reinfecciones en adultos sanos (MacCullers y cols., 1995; Patnaik y cols., 1995). Existen situaciones especiales asociadas a infección VIH-1 (Knox y cols., 1995) y a TMO alogénico (Drobyski y cols., 1994).

Ambas variedades víricas se han detectado en los cerebros de los pacientes que murieron por causas directamente relacionadas o no con VHH-6 (Campadelli-Fiume y cols., 1999; Carrigan y cols., 1996; Challoner y cols., 1995; Drobyski y cols., 1994; Knox y cols., 1995; Luppi y cols., 1994_a; Luppi y cols., 1994_b; MacKenzie y cols., 1995). Aunque los estudios sobre la diferente distribución de las dos variedades proporcionan resultados contradictorios (Challoner y cols., 1995; Hall y cols., 1998), se ha documentado la invasión del SNC durante la primoinfección por VHH-6B, pero no para la otra variedad.

2.3. Invasión del SNC en otras condiciones

Los estudios de infección por VHH-6 en el SNC de pacientes con sida no son concordantes. Mientras muchos estudios muestran a VHH-6 de forma frecuente (Knox y cols., 1995; Luppi y cols., 1995_b; Patnaik y cols., 1995; Saito y cols., 1995), otros dicen que es muy rara su presencia en el SNC (Achim y cols., 1994). Las claves pueden estar en las diferentes técnicas empleadas en la PCR (Luppi y cols., 1995_b; Saito y cols., 1995) o en el tamaño de la población estudiada.

También se demostró la presencia de VHH-6 (PCR), así como los anticuerpos frente a VHH-6 (IHQ), en la materia blanca degenerada de la médula espinal de una anciana con mielopatía crónica y paraparesia espástica progresiva, lo que sugirió la intervención del virus en la patogenia (MacKenzie y cols., 1995).

2.4. Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una grave enfermedad del SNC que afecta a adultos jóvenes (primer episodio entre 20 y 40 años) que habitan zonas de clima templado (prevalencia $\geq 0,06\%$ en el norte y centro de Europa, sur de Canadá y norte de los Estados Unidos (Francis y cols., 1996)) y que se caracteriza por una desmielinización nerviosa progresiva (axones del nervio óptico, materia blanca periventricular, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal) que provoca incapacidad crónica y muerte de forma eventual (Campadelli-Fiume y cols., 1999). La clínica de la EM la conforman signos neurológicos y síntomas recurrentes y remitentes en el tiempo que afectan a numerosas vías nerviosas.

Se han descrito tres formas de presentación de la enfermedad. La forma más común (30-50%) es la presentación en brotes o forma remitente-recidivante de EM (EMRR), que se caracteriza por la aparición de episodios de disfunción neurológica más o menos reversibles que se repiten en el tiempo y que van dejando secuelas funcionales neurológicas. Un porcentaje elevado de estos pacientes, en un tiempo medio de 5 años, pasan del curso en brotes a un curso progresivo (forma progresiva secundaria, EMPS). Un escaso porcentaje de los pacientes (10-20%) presentan desde un principio un curso progresivo lento (forma progresiva primaria, EMPP) (Fernández y col., 1997).

Es necesario definir las escalas de disfunción neurológica (DSS-Disability Status Scale), posteriormente ampliadas (EDSS-Expanded Disability Status Scale) y desarrolladas por Kurtzke, que actualmente se emplean en el seguimiento clínico de la enfermedad. En ellas se puntúa la disfunción neurológica desde 0 (situación normal) a 10 (fallecido), con intervalos de 0,5 puntos. La puntuación personalizada se obtiene de la valoración cuantitativa de las alteraciones presentes en lo que Kurtzke denominó sistemas funcionales (FS), para lo cual se diseñaron ocho escalas destinadas a ponderar los resultados de la historia clínica y la exploración neurológica (función piramidal, función cerebelosa, función del tronco cerebral, función sensitiva, función de los esfínteres, función mental, espasticidad). Este sistema permite al clínico una monitorización personalizada detectando en cada caso el momento en que la enfermedad avanza hacia la forma progresiva, y también constituye una herramienta de medición de particular utilidad en el seguimiento de los enfermos incluidos dentro de un protocolo de ensayos clínicos (Fernández y col., 1997).

Por otro lado, la teoría más aceptada sobre la patogénesis de esta enfermedad es que una reacción autoinmune provoca la destrucción de la mielina, sustancia formada a partir de las membranas celulares de los oligodendrocitos (Kirschner y cols., 1992), lo que da origen a la diferente sintomatología de la EM, según la vía nerviosa que se vea involucrada. Se desconoce el origen exacto de esta respuesta inmune anómala; sin embargo, se viene proponiendo una etiología infecciosa, vírica concretamente, desde el siglo XIX (Buchmeier y cols., 1999; Johnson, 1994; Meinl, 1999). Esta especulación sobre la etiología vírica de la EM se sustentó en tres áreas de investigación:

(1) *Estudios epidemiológicos*, que indicaron que la infección durante la infancia o la adolescencia (Stohlman y col., 2001) por ciertos agentes era un factor determinante en la génesis de la EM, así como que ciertas infecciones podían desencadenar los brotes de la enfermedad una vez establecida.

(2) *Experimentos en modelos animales*, que sugirieron que ciertos virus podían causar desmielinización, mediante diversos mecanismos (Rice, 1992; Azoulay-Cayla, 2000) tras un largo periodo de incubación con cursos recidivantes y remitentes.

(3) *Estudios en enfermos con EM*, que mostraron de forma persistente niveles elevados de anticuerpos frente a ciertos virus en el suero y en LCR, pero no en los controles (Johnson, 1994).

La hipótesis patogénica más aceptada en la actualidad dice que la EM es el fruto de la conjunción de una determinada predisposición genética y un factor ambiental desconocido que, juntos en un mismo individuo, causarían una alteración del sistema inmunológico, originándose una respuesta de tipo autoinmune responsable de la inflamación y la desmielinización propias de la enfermedad (Fernández y col., 1997;

Fernández, 2000). Por lo tanto, la EM se encuadra dentro de una clase de enfermedades neurológicas que presentan una particular susceptibilidad genética por parte del hospedador a un factor ambiental a veces no bien caracterizado (Belec, 1999). Como posibles agentes ambientales de la EM se han implicado principalmente distintos virus (Cermelli y col., 2000; Stohlman y col., 2001) como el virus del sarampión, el HTLV-I y LM7 (retrovirus) (Cook y cols., 1995; Johnson, 1994) y, sobre todo, algunos virus de la familia *Herpesviridae*: VVZ, VHS, VEB, CMV y VHH-6 (Haarh y cols., 1994; Ross y cols., 1995), debido a que todos son capaces de establecer latencia y reactivarse periódicamente y porque algunos, como VHH-6, poseen un marcado neurotropismo y son capaces de inducir desmielinización (Johnson, 1994) en modelos animales.

La EM es una enfermedad con una profunda heterogeneidad en cuanto al curso clínico, apariencia neurorradiológica de las lesiones, susceptibilidad genética, respuesta a la terapia, etc, lo cual sugiere diversos mecanismos patogénicos. La anatomía patológica se caracteriza por la aparición de placas de desmielinización en la sustancia blanca de los nervios ópticos, áreas paraventriculares y subapicales, tallo cerebral y médula espinal. La invasión de la sustancia blanca por células inflamatorias es la responsable de la destrucción de la mielina (Seinman, 1996). Las células plasmáticas se acumulan en las placas, generalmente en el centro, y la respuesta astrogliar, en los bordes de las lesiones. Se observa un descenso significativo del número de oligodendrocitos en las placas, como primer paso del progreso de la enfermedad. Se intuyó que el posible desencadenante o cooperador en estos fenómenos de carácter inflamatorio pudiera ser un agente infeccioso localizado en las mismas lesiones, por lo que las investigaciones se dirigieron a su búsqueda *in situ*.

Se han caracterizado cuatro patrones de desmielinización, definidos en función de la pérdida de mielina, la geografía y la extensión de las placas, los patrones de destrucción de los oligodendrocitos y la evidencia inmunopatológica de activación del complemento. El patrón I presenta semejanzas con la encefalomiелitis autoinmune mediada por células T, y el II, con la encefalomiелitis autoinmune mediada células T más anticuerpos. Los otros patrones (III y IV) son altamente sugerentes de distrofia primaria de los oligodendrocitos, indicativa de desmielinización inducida por toxinas o virus. Por otro lado, el patrón de desmielinización es heterogéneo en un momento dado entre los pacientes, pero homogéneo dentro de las lesiones activas del mismo paciente. Esta heterogeneidad de placas puede tener implicaciones en el diagnóstico y la terapia de esta enfermedad (Lucchinetti y cols., 2000).

Recientemente se han propuesto cuatro posibles mecanismos por los cuales los agentes víricos pueden inducir desmielinización (Stohlman y col., 2001), sin conocerse cuáles de ellos actúan en la patogénesis de la EM. El primero de ellos se inicia a partir de la infección directa de la oligodendroglía, originando muerte celular con las subsiguiente degeneración y eliminación de la mielina. El segundo modelo propuesto señala que una infección persistente de la oligodendroglía, con o sin la presencia del virus, da lugar a la pérdida de la homeostasia con el resultado de muerte celular. El tercer mecanismo se debe a una fuerte respuesta inflamatoria específica frente al virus, el cual se replica en células diferentes a las de la oligodendroglía, pero las citoquinas y otros mediadores dañan directamente a estas células y a la mielina. Por último, se ha propuesto que la infección vírica inicia una respuesta inmune específica frente a la oligodendroglía y la mielina, ya que la inflamación que origina el virus induce el procesamiento de los componentes de la oligodendroglía y de la mielina para su

presentación a las células T. Además, los antígenos derivados de las proteínas víricas pueden presentar cierta homología con los componentes celulares del hospedador, activándose a las células T autorreactivas.

Sin embargo, previamente se han publicado trabajos en los que se afirma que ningún agente vírico causa desmielinización de forma específica en hombres o animales, ya que los potenciales mecanismos de desmielinización inducidos por virus, que requieren infección persistente de los tejidos del hospedador o daño orgánico mediado por la respuesta inmune, podrían tener lugar tanto en presencia como en ausencia del virus (Cook y cols., 1995). Por el contrario, en otros trabajos se indica la idoneidad de los modelos animales para mostrar cómo interaccionan los virus y los factores genéticos del hospedador para causar desmielinización mediada por la respuesta inmune, de forma similar a como sucede en algunas formas con EM (Monteyne y cols., 1998).

Como se ha mencionado brevemente, el complemento parece jugar un papel importante en el establecimiento de las lesiones de EM, induciendo daño físico a las células productoras de mielina. Sin embargo, cada célula somática presenta multitud de moléculas unidas a la membrana que, generalmente, inhiben la activación de la cascada del complemento y que la protegen de la lisis dependiente del complemento. Se ha demostrado que en el suero de los pacientes con EMRR en fase aguda están presentes anticuerpos dirigidos frente a dos de estas moléculas reguladoras (CD46 y CD59). Estos anticuerpos se dirigen al centro activo de CD46 y CD59 e inactivan su función reguladora, lo que provoca un mecanismo por el cual las células nerviosas pueden ser dañadas por el complemento (Pinter y cols., 2000).

Tradicionalmente se ha subestimado la importancia de la participación de los axones en las enfermedades desmielinizantes, pero se conoce que la mielinización provee señales tróficas extrínsecas que influyen en la correcta maduración y en la supervivencia a largo plazo de los axones. Existen muchos ejemplos de que el daño axónico es una consecuencia de los desórdenes de la mielina. Charcot, en el siglo XIX, describió la patología de la EM en términos de desmielinización y recambio parcial de los axones. Informes recientes demuestran una fuerte relación entre desmielinización inflamatoria en las lesiones de EM y sección transversal de los axones, indicando la pérdida axónica en el inicio de la enfermedad (Stohlman y col., 2001). Esta afectación axónica también se ha observado en modelos animales (TMEV-IDD y encefalomiелitis alérgica experimental). Por ejemplo, en estos modelos se ha observado que la lipoproteína y la glucoproteína asociadas a la mielina son esenciales para mediar las señales tróficas derivadas de la mielina dirigidas hacia los axones (Bjartmar y cols., 1999). La pérdida axónica que sigue a la desmielinización se asocia con anomalías electrofisiológicas y se relaciona fuertemente con la reducción de la coordinación motora y la atrofia de la médula. Estos hallazgos demuestran que la pérdida axónica puede seguir a la desmielinización primaria de origen inmune del SNC, o incluso ser previa a la degradación de la mielina (Stohlman y col., 2001), y la gravedad de la pérdida axónica casi se corresponde con el grado de atrofia de la médula espinal y con los déficits neurológicos (McGavern y cols., 2000, Sathornsumettee y cols., 2000). Asimismo, la presencia de fibras axónicas medias o largas remielinizadas dentro de una única lesión se ha visto que está directamente relacionada con la preservación de la función neurológica implicada (Sathornsumettee y cols., 2000).

También se ha observado que la proteína básica oligodendrocítica asociada a la mielina (MOBP) causa experimentalmente encefalitis alérgica y se ha asociado a EM. La encefalitis alérgica experimental presenta un curso clínico grave, una fuerte infiltración de linfocitos T CD4+ y una menor presencia de CD8+ y macrófagos de la microglía alrededor de los vasos y la materia blanca del SNC. Los linfocitos de sangre periférica obtenidos a partir de pacientes con EMRR presentan una respuesta proliferativa frente a MOBP, especialmente a los aminoácidos 21-39, por lo que MOBP parece asociarse con la desmielinización presente (Holz y cols., 2000).

Por otra parte, volviendo a la supuesta etiología vírica, otros experimentos en modelos animales estudian cómo participan ciertos virus en la alteración de la respuesta inmune causante de la enfermedad. Por ejemplo, se ha intentado explicar parte de la patología neurológica de la EM mediante la participación de retrovirus y la actividad citotóxica dirigida específicamente hacia las células de la glía. Estos retrovirus endógenos (MSRV; HERV-TcR y HERV-7q) son capaces de producir proteínas como la glucoproteína enverina, codificada a partir del dominio *env* de HERV-7q, la cual presenta una región inmunorreguladora. La detección, en varios fluidos biológicos, de actividad citotóxica capaz de inducir muerte celular programada en los oligodendrocitos y astrocitos sugiere la posibilidad de que el fenómeno de desmielinización forme parte directamente del daño de las células de la glía. Además, tanto la expresión de retrovirus como la producción del factor citotóxico se han manifestado en los cultivos de macrófagos / monocitos de EM y en el LCR de EM. (Rieger y cols., 2000).

En otro estudio se trata de la participación de ciertos receptores celulares para VHH-6 en la patogénesis de la EM. Tanto VHH-6A como VHH-6B emplean CD46

humano como receptor celular (Clark, 2000; Santoro y cols., 1999). Tanto la infección aguda como la fusión a la célula de VHH-6 se inhiben específicamente por mAbs frente a CD46, y las células no humanas resistentes a la fusión y entrada de VHH-6 se hacen susceptibles después de la expresión de CD46 humano recombinante. Este receptor podría explicar el tropismo y la patogenicidad de VHH-6 (Santoro y cols., 1999).

Aunque no existe un consenso sobre la participación en la patogénesis de la EM de los agentes víricos, existen multitud de trabajos (resumidos en la tabla 3) donde se reflejan ensayos que emplean técnicas de distinta naturaleza para detectar la infección vírica en muestras de tejidos del SNC, suero, LCR y CMSP de enfermos con EM. A modo de ejemplo, citaremos a continuación los más relevantes.

En un trabajo publicado en 1993, sólo se hallaron secuencias de ADN de VHH-6 en las CMSP de 1 de 31 pacientes con EM y de 1 de 24 controles. Mediante Southern blot se observó una inesperada cantidad de secuencias víricas en el paciente con EM. Dada la escasez de secuencias halladas en los pacientes con EM y la elevada tasa de anticuerpos, este hallazgo se interpretó como un fenómeno acompañante de la EM más que con una reactivación de una infección latente (Sola y cols., 1993).

En 1995 se detectó el genoma del VHH-6 en un alto porcentaje (78%) de muestras cerebrales de pacientes con EM y de los controles (74%). Esto demostró que la prevalencia en la población general era muy elevada y que el virus es un comensal de los tejidos cerebrales. Sin embargo, cuando se emplearon técnicas IHQ para determinar la localización del virus, se encontraron diferencias significativas, tanto cualitativas como cuantitativas, respecto a la tinción nuclear de las células del SNC, concretamente, de los núcleos de los oligodendrocitos de la materia blanca en los enfermos con EM en

comparación con los controles, que incluyeron los cerebros de cuatro fetos. Además, estos oligodendrocitos se asociaban frecuentemente a la presencia de placas, lo que sugirió una conexión específica del VHH-6 con las lesiones patológicas características. Las conclusiones de este trabajo fueron varias: la infección por VHH-6 tiene lugar de forma temprana y su persistencia en el SNC puede dar lugar a la reactivación del virus con producción de daño citopático o inmunológico de los oligodendrocitos como consecuencia de la intensa respuesta inflamatoria local. Pero estas observaciones, que demostraron una asociación evidente entre VHH-6 y EM, fueron insuficientes para establecer una conexión causal definitiva. Sugirieron que un ensayo clínico con un antivírico adecuado aplicado a enfermos con EM podría arrojar más evidencias acerca del papel del VHH-6 en la etiopatogenia de esta enfermedad neurológica (Challoner y cols, 1995).

Un año después, se examinaron tejidos cerebrales y de médula espinal de una paciente que murió de forma fulminante de una enfermedad desmielinizante diagnosticada clínicamente como EM aguda. La tinción IHQ (que estudia los productos génicos expresados en la superficie celular) de las muestras evidenció una infección activa por VHH-6 ampliamente extendida, lo que les sugirió que la enfermedad era una leucoencefalitis subaguda por VHH-6 (SHLE). El mecanismo patogénico propuesto para la desmielinización fue el efecto citopático del virus al infectar las células del SNC y/o la respuesta inmune frente a las proteínas víricas expresadas en la superficie de estas células. En este caso concreto sí parece que la relación causal del VHH-6 con la enfermedad quedó suficientemente demostrada. Al tratarse de un estudio en un paciente con EM atípica no se concluyó acerca de la posible relación etiológica (Carrigan y cols., 1996).

En 1996 se investigó la presencia de secuencias de ADN de virus herpes capaces de producir infección latente (VHS, VVZ, VEB, CMV y VHH-6) en los cerebros *postmortem* de pacientes con EM, así como en controles de enfermos con Parkinson, Alzheimer y otros procesos no neurológicos. Las muestras se componían de materia gris y blanca no alterada y tejido de las placas, activas e inactivas. Se observó una mayor frecuencia de ADN de VHS, VVZ y VHH-6 en los casos con EM, y ésta era mayor en las placas activas que en las inactivas, pero sin diferencias estadísticas. Concluyeron que la presencia diseminada de estos virus en todos los tejidos hace difícil una asociación etiológica con la EM. Sin embargo, la localización celular del virus y la relación de la patología de la enfermedad con los periodos de latencia vírica podría revelar la existencia de una conexión etiológica (Sanders y cols., 1996).

En este mismo año, se encontraron secuencias específicas de VHH-6 mediante PCR en las CMSP de un paciente con EM portador de una infección latente por el virus. Este paciente experimentó una inflamación del SNC diagnosticada como encefalitis, detectándose VHH-6 antes y durante el episodio inflamatorio. También se investigó el LCR de este paciente mediante PCR, detectándose el virus en la muestra recolectada durante la fase aguda, mientras que la PCR del LCR previo a la encefalitis fue negativo. La conclusión que extrajeron del estudio fue que la encefalitis se debió a la reactivación de una infección latente del VHH-6 dentro del SNC en un paciente que presentaba una respuesta inmune alterada debida a la EM. En este trabajo no se relacionó al VHH-6 con los posibles brotes de la EM (Merelli y cols., 1996).

En 1997 se investigó, mediante PCR, la presencia del genoma de VHH-6 y de VHH-8 en placas de cerebro y médula espinal, así como en CMSP de pacientes con EM

frente a los cerebros de un grupo control formado por niños nacidos muertos y adultos normales. Los resultados fueron positivos frente a ambos virus en todas las muestras, excepto para las secuencias del VHH-6 en los cerebros de los niños. Hay que destacar como dato curioso que al ADN cerebral de 5 pacientes con EM fue positivo para VHH-8 y negativo para VHH-6, y viceversa para un paciente que murió de neuromielitis óptica. Al no obtener diferencias estadísticas, no pudieron establecer la relación de estos virus con la patogénesis de la EM. A pesar de ello, una vez demostrado el fuerte neurotropismo de ambos virus, se sugirió que el SNC era un reservorio para ambos. Estos autores también concluyeron que era escasamente probable la transmisión congénita de la infección por VHH-6, aunque su adquisición tiene lugar de forma temprana en la infancia (Merelli y cols., 1997).

En 1997 se detectaron, mediante nested-PCR, las secuencias de VHH-6 en sueros de enfermos con EM como marcador de infección activa. Obtuvieron 15 de 35 resultados positivos en enfermos con EM, frente a ninguno en los controles. Dedujeron que la detección del ADN de VHH-6 en el suero de un subgrupo de pacientes con EMRR, presuntamente infectados con VHH-6 desde hacía años, indicó que el virus pudo reactivarse y explicar las respuestas de IgM elevadas en algunos de ellos. Además, se observó que la detección del ADN de VHH-6 puede fluctuar con el tiempo. Con todos estos datos se concluyó que cuando se reactiva la infección por VHH-6, la actividad vírica observada en estos pacientes puede reflejar un periodo de tiempo concreto durante el cual se produce la progresión de la EM hacia formas más graves. En este caso, el virus sería un cofactor de la enfermedad (Soldan y cols., 1997).

En 1997 se realizó un estudio sobre la presencia, mediante nested-PCR, de las secuencias de ADN de 7 virus herpes (VHS-1 y 2, VVZ, VEB, CMV, VHH-6 y 7) en los LCR y sueros de los pacientes con EM y neuritis óptica. No hallaron ADN de ningún virus en ninguna de las muestras estudiadas. Concluyeron que sus hallazgos contradecían la opinión difundida de que estos virus eran la causa de la enfermedad, pero no rechazaban la posibilidad de que la infección vírica persistente en el SNC se asocie de alguna forma a la lesión cerebral de los pacientes con EM (Martín y cols., 1997). La evidencia indirecta del papel patogénico de los virus herpes se manifestó a través de un ensayo terapéutico con aciclovir, que redujo la frecuencia de las exacerbaciones en pacientes con EMRR (Lycke y cols., 1996).

En 1998 se investigó la presencia de ADN de VHH-6, VEB y CMV mediante PCR a partir de los LCR de enfermos con EM frente a un grupo de enfermos con otras enfermedades neurológicas (OEN). Detectaron secuencias de VHH-6 en los LCR de los enfermos con EM que presentaban la IgG positiva frente al virus (16,7%), mientras que no se detectó ADN vírico en ninguno de los LCR de los controles con IgG positiva. Además, la variedad B fue la más frecuentemente aislada a partir de las CMSP de los pacientes con EMSP o EMRR (Ablashi y cols., 1998). Sin embargo, en una publicación del mismo año, dada la escasa detección de ADN de VHH-6 (mediante PCR) en las CMSP de los pacientes con EMRR y EMSP, se desestimó la correlación entre infección de CMSP por VHH-6 y el desarrollo de la EM (Mayne y cols. 1998).

En 1999 se informó que el 36% de las muestras cerebrales de enfermos con EM fueron positivos al ADN de VHH-6 (mediante una PCR que amplifica el gen U11 que expresa la proteína antigénica 101K), frente a sólo el 13,5% de los controles. Mediante

IHQ, las diferencias se hicieron más patentes (47% vs. 0%). Los resultados reflejaron que los cerebros de los enfermos con EM contenían proteínas y fragmentos de ADN de VHH-6 en cualquier fase. Estas conclusiones no discreparon con la posible implicación del virus en la patogénesis de la enfermedad (Friedman y cols., 1999).

En un estudio más reciente se analizaron las CMSP procedentes de enfermos con EMRR y donantes de sangre sanos para detectar, mediante nested-PCR, la presencia de secuencias de ADN de VHS, VVZ, VEB, CMV, VHH-6, VHH-7 y VHH-8. Sólo se encontraron diferencias significativas para VHH-6: un 21,5% de muestras positivas en donantes, frente a un 49,02% en enfermos de EM. Los resultados obtenidos llevaron a la conclusión de que VHH-6 establece una infección sistémica en los enfermos con EM, si bien no se conoce si interviene en el desarrollo de la enfermedad. Se propuso que tal vez VHH-6 se tratara del mencionado factor ambiental que contribuiría a alterar el sistema inmunológico del individuo, provocando la respuesta autoinmune que diera lugar a la EM (Álvarez y cols., 2000).

A fin de verificar el posible papel de los virus herpes como desencadenantes o agravantes de los ataques agudos en EMRR, se estudió la prevalencia de los mismos en CMSP tomadas de 22 pacientes durante el brote y la fase estable y de 18 controles. Se buscó el ADN de VHS-1, VHS-2, CMV, VEB y VHH-6 mediante nested-PCR. El ADN de VEB y VHH-6 se detectó con más frecuencia en todos los grupos sin diferencias estadísticas. El ADN de CMV se observó en los enfermos de EM en ambas fases, pero no en los controles. El ADN de VHS-1 sólo se halló en el 13% de los enfermos con EM en la fase aguda, pero no en la fase estable ni en los controles. Concluyeron que VHS-1 se replica activamente en los pacientes durante los brotes de EM. A continuación, se

buscó el ARN_m y el ADN de VHS-1 en las CMSP de 15 pacientes en la fase aguda de EM frente a 15 controles. Se encontró ARN_m y ADN en un número significativo de pacientes con EM aguda, y en ningún control, con lo que se dedujo que VHS-1 probablemente desempeñara un papel en la producción de los ataques de EM (Ferrante y cols., 2000). Para distinguir entre infección latente y activa por VHH-6 y VHH-7, y con el fin de aclarar las implicaciones de estos virus en la enfermedad, también se analizó la transcripción vírica. A diferencia del trabajo anterior, los resultados indicaron que las secuencias víricas encontradas en las CMSP de los pacientes con EM se mantienen sin transcribir (Rotola y cols., 2000).

Con el objeto de aclarar las implicaciones de VHH-6 y VHH-7 en la EMRR, se analizaron de títulos de IgG e IgM frente a VHH-6 mediante IFI en suero y LCR, así como el ADN de VHH-6 y VHH-7 en el LCR y el ADN de VHH-6 en las CMSP. No se detectó ADN vírico en ninguna muestra de LCR, y su frecuencia de ADN de VHH-6 presente en las CMSP no fue diferente de forma significativa entre los enfermos con EM y los controles. Además, los títulos de anticuerpos fueron comparables a los de la población general, hallándose que un 30,4% de los pacientes con EM fueron seronegativos frente a VHH-6 (Taus y cols., 2000). En otro trabajo similar, se detectó la frecuencia de ADN de VHH-6 y VEB en las CMSP de pacientes con EM y un grupo control mediante PCR. El ADN de VEB se detectó en todas las muestras, y el ADN de VHH-6 se detectó en el 7% de los pacientes con EM y en el 14% de los controles (Hay y cols., 2000). Ambos estudios sugirieron que no existe asociación entre la presencia de VHH-6 en las CMSP y la EM.

En otro trabajo se investigó qué papel puede desempeñar el neurotropismo de las variedades de VHH-6 en la patogenia de la EM. Se observó que en algunas placas activas el tejido presenta ADN diferente al del virus prototipo, por lo que se sugirió la posibilidad de que una variedad de la cepa participara en la patogénesis de la enfermedad. Para ello, se investigaron las secuencias de ADN en las CMSP de 34 pacientes con EM, mediante nested-PCR. Para distinguir la variedad, se empleó la digestión con ER de los productos amplificados. Siete de los pacientes con EM y 2 con mielitis transversal idiopática presentaron secuencias de VHH-6A, frente a ningún control. Dedujeron que la infección latente por VHH-6A en las CMSP de pacientes con EM puede relacionarse con la EM (Kim y cols., 2000).

También existen multitud de estudios serológicos publicados en los que se detectan anticuerpos frente a VHH-6, VEB y CMV, muchos de los cuales se complementan con técnicas de biología molecular.

En un trabajo publicado en 1990 se halló síntesis intratecal de anticuerpos frente a VVZ y CMV en los pacientes con EM, sugiriéndose que el estudio de la actividad de anticuerpos antivíricos en el LCR era un método adecuado en el seguimiento y diagnóstico de la enfermedad (Izquierdo, 1990).

Mediante IFA se detectaron títulos significativamente mayores de anticuerpos específicos anti-VHH-6 en los sueros y LCR de 126 pacientes con EM frente a 500 donantes de sangre sanos. Explicaron esta respuesta elevada como la posible activación de la transcripción de ciertos genes (víricos o celulares), por parte de las proteínas del virus, que contribuyesen a las anomalías inmunes asociadas a la enfermedad (Sola y cols., 1993).

En otro estudio más reciente no se observaron diferencias significativas de anticuerpos anti-VHH-6 entre los pacientes con EM y los controles, empleando un ELISA competitivo como técnica de detección. Teniendo en cuenta que se trataba de un estudio de seroprevalencia, no descartaron que una primoinfección tardía (en la pubertad) con VHH-6 pudiera influir en el desarrollo de la EM (Nielsen y cols., 1997).

En 1997 se investigó la presencia de IgM frente al antígeno temprano p41/38 de VHH-6 en los sueros de pacientes con EM, detectándose una marcada respuesta serológica en los pacientes con EMRR, comparada con la de los pacientes con EMSP, así como frente a otros pacientes con otras enfermedades neurológicas o autoinmunes. No se determinó con exactitud si los elevados títulos de anticuerpos obtenidos, junto con la presencia en suero de ADN de VHH-6 como marcador de infección activa, eran un mero fenómeno acompañante de la EM, o si, por el contrario, contribuían de alguna forma en la etiopatogenia de la enfermedad (Soldan y cols., 1997).

En otro trabajo se investigaron los anticuerpos frente a VHH-6, VEB y CMV en muestras de LCR y plasma de enfermos con EM y un grupo control con OEN. Encontraron una frecuencia mucho más elevada de IgG frente a antígenos tardíos (39,4%) de VHH-6 en los LCR de los enfermos con EM que en las de los enfermos con OEN (7,4%); los niveles de anticuerpos frente a VEB y CMV fueron mucho menores. En cuanto al plasma, se hallaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (enfermos con EM, OEN y donantes sanos) respecto a la respuesta de IgG e IgM frente al antígeno temprano p41/38 del VHH-6 (IgG: >68% (EM), 12,5% (OEN) y 27,8% (donantes); IgM: >56% (EM), 12,5% (OEN) y 19% (donantes)). Estos datos sugirieron que más de la mitad de los enfermos con EM presentaron infección activa por VHH-6,

junto con el aislamiento del virus a partir de los CMSP, contribuyó al mantenimiento de la hipótesis de que VHH-6 pudiera ser un cofactor en la patogénesis de algunos casos de EM (Ablashi y cols., 1998).

En un estudio realizado en Noruega en 1998 se compararon las seroprevalencias de anticuerpos anti-VEB con las de VHS, VVZ y CMV, mediante ELISA e IFI, en enfermos y controles. Hallaron una prevalencia significativamente mayor de IgG anti-VEB (frente antígenos VCA, EBNA y EA) en los pacientes con EM, mientras que las diferencias respecto a los otros virus no fueron significativas (Myhr y cols., 1998). No se investigaron anticuerpos anti-VHH-6.

En este mismo año se analizó el significado del 100% de la prevalencia encontrada frente a VEB en pacientes con EM en comparación con los controles, mediante un ELISA que diferenciaba el estadio de la infección por el virus. No se hallaron primoinfecciones en el grupo de enfermos con EM, lo que apoyaría la idea de que estos pacientes están previamente infectados por el virus, aunque no desveló si la infección por VEB es preceptiva para el desarrollo de la EM (Munch y cols., 1998).

En 1999 se detectó IgM frente a VHH-6 en el 80% los sueros de enfermos con EM, frente a sólo el 16% de los controles, observándose así la brusca respuesta serológica en estos enfermos (Friedman y cols., 1999).

En un estudio de casos-contróles se evidenció una fuerte asociación entre infección por VEB y EM, ya que la sensibilidad y la especificidad de los tests serológicos empleados frente a VEB señalaron una respuesta inmune específica en estos enfermos (Ascherio y col., 2000).

En 1999 se halló un claro predominio de anticuerpos IgG e IgM frente a VHH-6B (así como frente a VHH-6A y VHH-7) en los LCR de enfermos con EM frente a un grupo control. Se concluyó que la infección intratecal por VHH-6B (primaria o crónica activa) puede contribuir a la progresión hacia la EM, mientras que los efectos locales de VHH-6A y el VHH-7 parecen menos importantes (Ongradi y cols., 1999).

Más recientemente se determinó el papel que la infección o la reactivación de la infección por VHH-6 desempeñan en la patogénesis de la EM y en el síndrome de fatiga crónica (SFC). Para ello, se midieron los niveles de IgG e IgM en suero y se investigó la presencia del virus en las CMSP mediante cultivo para detectar las células que expresaban antígenos víricos y caracterizar los virus aislados según la variedad. Los niveles de IgG e IgM fueron elevados en los pacientes con EM y SFC en comparación con los controles. El 70% de los enfermos con EM presentaron IgM frente a los antígenos tardíos del VHH-6 (cápside) en comparación con los controles (15%) y los enfermos con OEN. El 54% de los pacientes con EM albergaban células productoras de antígenos precoces y tardíos frente a VHH-6, y el 87% de los aislados fueron de la variedad B. Sólo un aislado del grupo control fue de la variedad B. Los aislados de los pacientes con SFC fueron predominantemente de la variedad A (70%) y los de los controles, de la variedad B. Dos pacientes con SFC presentaron infección persistente por VHH-6 durante un periodo de 2,5 años, y se demostraron respuestas inmunes celulares específicas en las CMSP de 10 pacientes. Los altos niveles de anticuerpos y ADN de VHH-6 encontrados en los pacientes con EM y SFC apuntaron que la reactivación probablemente participe en la patogénesis de ambos desórdenes (Ablashi y cols., 2000).

También se ha estudiado la respuesta inmunoproliferativa frente a VHH-6 en los pacientes con EM para determinar la participación del virus en la patogénesis. Para ello, se compararon las respuestas linfoproliferativas frente a lisados celulares infectados con VHH-6A (U1102), VHH-6B (Z29) y VHH-7 (H7SB) en pacientes con EM y controles. Las respuestas linfoproliferativas para los lisados de VHH-6B y VHH-7 fueron similares en los enfermos (78% y 28%) y en los controles (71% y 23%). Para el lisado de VHH-6A, la respuesta linfoproliferativa en los controles fue del 33%, frente al 67% de los enfermos con EM. Estos resultados indicaron que la respuesta linfoproliferativa frente a VHH-6A, cuyo neurotropismo es mayor, estaba incrementada en pacientes con EM (Soldan y cols., 2000).

Con frecuencia se observan anticuerpos frente a VEB en los LCR de los pacientes con EM, pero sus antígenos diana eran desconocidos. Mediante immunoblotting específico se intentó determinar si esa diana era el antígeno nuclear de VEB, EBNA-1. Los índices de anticuerpos se midieron mediante ELISA y se calcularon con la fórmula de Reiber y Lange que incluye factores de corrección para la ruptura de la barrera hematoencefálica y la síntesis intratecal de IgG policlonal. Se observó un patrón de anticuerpos frente a EBNA-1 distinto en 5 de 51 pacientes con EM, no así en los 12 controles ($p = 0,037$). El índice de anticuerpos fue muy alto en este grupo comparado con los niveles observados en otras infecciones víricas del SNC. Los resultados obtenidos sugirieron que en un subtipo de pacientes con EM, EBNA-1 puede ser la principal diana de los anticuerpos específicos frente a VEB (Rand y cols., 2000).

Se estudió la prevalencia de ciertos herpesvirus, incluyendo VEB, en los sueros de 108 pacientes con EM y 163 controles sanos. Los anticuerpos frente a VEB estuvieron

presentes en el 100% de los enfermos con EM y en el 90,1% de los controles. La primoinfección fue detectada en un 3,7% de los controles sanos, y en ningún enfermo con EM. De acuerdo con estos resultados se indicó que la infección por VEB era un prerrequisito más que una consecuencia de la enfermedad. Además, se siguió prospectivamente a 19 pacientes mensualmente durante un año. Se observó un incremento de la respuesta de IgM e IgA frente a los antígenos tempranos y ADN del virus en el 72,7% de los pacientes con exacerbaciones durante este periodo, no detectándose ADN en el suero de los pacientes con EM clínicamente estable. Estos autores concluyeron que la reactivación por VEB estaba implicada directamente en la patogénesis de la EM, lo que concordaba con los hallazgos que indicaban que las exacerbaciones de la EM se reducían notablemente en pacientes tratados con aciclovir (Wandinger y cols., 2000).

Existen otros trabajos publicados donde se relacionan otros virus distintos de los herpes con la EM. Así, la enfermedad desmielinizante inducida por coronavirus mimetiza la patología de la EM (Lavi y cols., 2000) y la infección de las células de la glía por este virus puede llevar a la producción de moléculas inflamatorias asociadas a la EM (Edwards, 2000).

Otros estudios también han observado la producción de partículas retrovíricas (RVP) en cultivos celulares obtenidos a partir de pacientes con EM. Esta producción *in vitro* parece ser específica de los enfermos con EM, pero no se descarta que se incremente o se active por desencadenantes como los herpes (Perron y cols., 2000).

Igualmente, se ha estudiado la posible participación de retrovirus endógenos (HERV) en la patogénesis de la EM. Para ello se analizó la proliferación estimulada de

péptidos HERV y la producción de citoquinas en las CMSP en pacientes con EM aguda o estable, observándose proliferación de péptidos y producción de citoquina de tipo 1 en los pacientes con EM aguda, pero no en los pacientes con EM estable, donde predominó la citoquina de tipo 2. Las respuestas de péptidos HERV estimuladas inmunológicamente se modificaron mediante cambios en la expresión de la enfermedad, mediadas por linfocitos T CD4+ y no relacionadas con las moléculas HLA-II. Estos datos sugieren que es posible la participación de HERV y de las respuestas inmunes específicas frente a HERV en la patogenia de la EM (Clerici y cols., 1999).

Los pacientes con EM pueden desarrollar espontáneamente células mononucleares a partir de líneas celulares B linfoblastoides, cosa que ocurre raramente en individuos sanos. Estas células suelen presentar partículas retrovíricas y VEB. Se especula que una infección dual con estos agentes podría presentar implicaciones en la etiología de la EM. Esta hipótesis se podría sostener si se confirmara que la infección previa por VEB fuera necesaria para el desarrollo de la EM (Haahr y cols., 2000).

Otros autores señalan la posibilidad de que una infección transitoria (¿vacuna triple vírica?) pueda estar implicada en la patogénesis de la EM, por estimulación de la respuesta autoinmune frente a la mielina. Modificando las vacunas se podría evitar totalmente esta posibilidad (Atkins y cols., 2000).

Por otro lado, se han encontrado múltiples evidencias de la infección por VHH-6 en las placas y en el suero de enfermos con EM. Mediante PCR *in situ* se determinó la prevalencia de localización celular de VHH-6, VJC y VIH-1 en enfermos con EM, LMP, sida y tejidos control del SNC, y la expresión génica se detectó mediante IHQ (p41 y gp101 de VHH-6). Se detectaron una alta cantidad de secuencias de VHH-6 en

las células de las lesiones de la materia blanca de los enfermos con EM y LMP, y una concentración apreciable en los alrededores de las lesiones. VHH-6 se encontró principalmente en los oligodendrocitos, pero también en las neuronas. VHH-6 era más abundante que VJC en las lesiones de LMP, y VIH-1 era más abundante que VHH-6 en sida. Las cantidades de ADN de VHH-6 encontradas en cerebros de enfermos con sida y controles fueron variables. La frecuencia de células infectadas tendía a aumentar con la edad. Estos resultados reafirmaban la hipótesis de que la reactivación de la infección por VHH-6 puede participar en la patogénesis de estas enfermedades desmielinizantes (Blumberg y cols., 2000).

De todos estos datos se puede deducir que existe una posible conexión patogénica entre VHH-6 y EM.

Tabla 3. Resumen de las aportaciones científicas más relevantes sobre la relación entre VHH-6, CMV y VEB y EM. Los datos se exponen cronológicamente, y dentro de un mismo año, por orden alfabético según el apellido del primer autor.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Izquierdo y cols., 1990.	Enfermos con EM.	LCR.	IFA.	Síntesis intratecal de anticuerpos frente a CMV (y VVZ) en enfermos con EM.	El estudio de los Acs antivíricos en el LCR: utilidad en el seguimiento y diagnóstico de la enfermedad.
Sola y cols., 1993.	Enfermos con EM y donantes sanos.	Suero, LCR y CMSP.	IFA, PCR, Southern-blot frente a VHH-6.	Escasez de secuencias en EM (1/34) y en controles (1/24); alta tasa de Acs (en 126 enfermos con EM y en 500 donantes).	VHH-6: activación de la transcripción de ciertos genes que producen anomalías inmunes asociadas a EM.
Challoner y cols., 1995.	Pacientes con EM y controles (adultos y fetos).	Tejido cerebral y suero.	PCR, IHQ frente a VHH-6.	Elevada seroprevalencia en población general; secuencias del virus en 78% de cerebros de enfermos vs. 74% de controles. Localización del virus en oligodendrocitos de placas con EM.	VHH-6: comensal del cerebro. La infección persistente en SNC produce reactivación con respuesta inflamatoria asociada y producción de daño citopático o inmunológico.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Carrigan y cols., 1996.	Paciente con EM aguda o leucoencefalitis subaguda por VHH-6.	Tejidos cerebrales y médula espinal.	IHQ frente a VHH-6.	Infección activa extensa.	El efecto citopático de VHH-6 al infectar las células del SNC y la respuesta inmune frente a las proteínas víricas producen desmielinización.
Merelli y cols., 1996.	Paciente con EM con encefalitis.	CMSP y LCR.	PCR frente a VHH-6.	Secuencias específicas VHH-6 en las CMSP y en el LCR recolectado durante la fase aguda de la encefalitis.	Encefalitis debida a reactivación de una infección latente por VHH-6 en el SNC en un paciente con una respuesta inmune alterada por la EM.
Sanders y cols., 1996.	Enfermos con EM y controles (Alzheimer, Parkinson, otras enfermedades no neurológicas).	Autopsia cerebral (materia gris, materia blanca y tejido de placas activas e inactivas).	PCR frente a VEB y CMV.	27 % de enfermos con EM y 38 % de los controles fueron positivos para VEB, y 5 % de las placas activas frente al 10 % de las inactivas. 16 % de enfermos con EM y 22 % de los controles fueron positivos a CMV, y 9 % de las placas activas frente a 10 % de las inactivas.	La presencia de VEB y CMV en todos los tejidos hace difícil una asociación etiológica. La localización intracelular del virus y la relación de la latencia con la patología pueden revelar una asociación.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Martin y cols., 1997.	EM y neuritis óptica.	Sueros y LCR.	Nested-PCR (VHH-6, VEB y CMV, hasta 7 virus herpes).	Ausencia de secuencias víricas.	Una infección persistente en el SNC puede asociarse a la lesión cerebral de estos pacientes.
Merelli y cols., 1997.	Pacientes con EM y controles (adultos sanos y niños nacidos muertos).	Placas de cerebro y médula espinal y CMSP.	PCR frente a VHH-6.	Secuencias de VHH-6 presentes en todos los tejidos estudiados.	Fuerte neurotropismo de VHH-6 y el cerebro es su reservorio. Adquisición temprana de la infección.
Nielsen y cols., 1997.	EM y controles.	Sueros.	ELISA.	No existen diferencias estadísticas respecto a los niveles de Acs anti-VHH-6 entre enfermos con EM y controles.	¿Una primoinfección tardía podría afectar al desarrollo de EM?
Soldan y cols., 1997.	Enfermos con EMRR y EMSP y controles (OEN y OEI).	Sueros.	Nested-PCR y ELISA.	ADN en sueros de enfermos con EMRR y altas respuestas de IgM. Detección de ADN fluctuante en el tiempo.	Reactivación vírica. Actividad vírica en ciertos periodos donde puede progresar la EM. VHH-6 puede ser un cofactor de EM.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Ablashi y cols., 1998.	Enfermos con EM y OEN.	LCR y CMSP.	ELISA frente a VEB, CMV y VHH-6 y PCR frente a VHH-6.	La frecuencia de IgG frente a VEB y CMV en los LCR de los enfermos con EM fue mucho menor que para la IgG frente a VHH-6 (39,4 %). Presencia de secuencias de VHH-6 en las CMSP.	Más del 50% de enfermos con EM presentan infección activa por VHH-6. VHH-6 puede ser cofactor de algunos casos de EM.
Mayne y cols., 1998.	EMRR y EMSP.	CMSP.	PCR frente a VHH-6.	Escasa detección de ADN.	Ausencia de correlación entre infección de CMSP por VHH-6 y desarrollo de EM.
Munch y cols., 1998.	EM y controles.	Sueros.	ELISA frente a VEB.	No hubo primoinfecciones por VEB en enfermos con EM.	La infección es previa al desarrollo de la enfermedad, aunque no desvela si es preceptiva.
Myhr y cols., 1998.	Enfermos con EM y controles.	Sueros.	ELISA e IFI frente a VEB, CMV y VHS.	Diferencia significativa de IgG anti-VEB (anti-VCA, EBNA y EA) en enfermos con EM frente a controles (100 % vs. 95,3 %).	Las diferencias frente a otros virus (CMV y VHS) no fueron significativas.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Friedman y cols., 1999.	Enfermos con EM y controles.	Tejidos cerebrales, sueros.	PCR, IHQ y ELISA frente a VHH-6.	IgM presente en 80% de los enfermos.	Brusca respuesta serológica en los enfermos con EM.
Ongradi y cols., 1999.	EM y controles.	LCR.	ELISA frente a VHH-6B.	IgG e IgM frente a VHH-6B en los enfermos con EM.	Infección intratecal activa por VHH-6B puede contribuir a la progresión de la enfermedad.
Ablashi y cols., 2000.	Pacientes con EM, SFC, un grupo con OEN y otro control.	Suero y CMSP.	ELISA frente a VHH-6 y cultivo para detectar las células que expresan Ags víricos y caracterizar los virus aislados según la variedad.	Niveles elevados de IgG e IgM en los pacientes con EM y SFC. IgM frente a los antígenos tardíos de VHH-6 (cápside) en el 70% de los enfermos con EM. 54% de pacientes con EM contenían células productoras de Ags tardíos y tempranos de VHH-6 y el 87% de los aislados fueron de la variedad B.	Los altos niveles de Acs y de ADN de VHH-6 encontrados en los pacientes con EM (y SFC) sugieren que la reactivación participa en la patogénesis de estos desórdenes.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Álvarez y cols., 2000.	Enfermos con EMRR y donantes de sangre sanos.	CMSP.	Nested-PCR frente a VHS, VVZ, VEB, CMV, VHH-6, VHH-7 y VHH-8.	Sólo se encontraron diferencias significativas para VHH-6: un 21,5% de muestras positivas en donantes, frente a un 49,02% en enfermos de EM.	VHH-6 establece una infección sistémica en los enfermos con EM. ¿Factor ambiental que contribuiría a alterar el sistema inmunológico, provocando la respuesta autoinmune que da lugar a EM?
Blumberg y cols., 2000.	Enfermos con EM, LMP, sida y tejidos control del SNC.	Tejidos del SNC.	PCR in situ para la localización celular de VHH-6, VJC y VIH-1. Expresión génica se detectó mediante inmunohistoquímica (p41 y gp101 de VHH-6).	Alta cantidad de secuencias de VHH-6 en células de materia blanca dañada con EM y LMP, y una concentración apreciable rodeando las lesiones. VHH-6 en oligodendrocitos y en neuronas. VHH-6 más abundante que VJC en lesiones de LMP. Cantidades variables de ADN de VHH-6 en cerebros de enfermos con sida y controles. La frecuencia de células infectadas tiende a aumentar con la edad.	Se ha encontrado evidencia de infección por VHH-6 en las placas y en el suero de enfermos con EM. La reactivación del VHH-6 puede participar en la patogénesis de estas enfermedades desmielinizantes.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Ferrante y cols., 2000.	22 pacientes durante el brote y la fase estable y 18 controles.	CMSP.	Nested-PCR frente a VHS-1, VHS-2, CMV, VEB y VHH-6. PCR frente a ARN _m de VHS-1.	ADN de VEB y VHH-6 más frecuente sin diferencias estadísticas entre grupos. ADN de CMV en enfermos con EM en ambas fases, pero no en controles. ADN de VHS-1 presente sólo en 13% de enfermos con EM en fase aguda, pero no en fase estable ni en controles. ARN _m y ADN en un número significativo de pacientes con EM aguda, y en ningún control.	VHS-1 se replica activamente en los pacientes durante los brotes de EM, por lo que probablemente desempeñe un papel en la producción de los ataques de EM.
Hay y cols., 2000.	Pacientes con EM y un grupo control.	CMSP.	ADN de VHH-6 y VEB mediante PCR.	El ADN de VHH-6 se detectó en el 7% de los pacientes con EM y en el 14% de los controles. El ADN de VEB se detectó en todas los pacientes y controles.	Los resultados del estudio no mostraron asociación entre la presencia de VHH-6 en las CMSP y EM.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Kim y cols., 2000.	Pacientes con EM, mielitis transversal idiopática y un grupo control.	CMSP.	Secuencias de ADN mediante nested-PCR. Variedad de VHH-6: digestión con ER de los amplificadores.	7 de los 34 pacientes con EM y 2 de 6 con mielitis transversal idiopática presentaron secuencias de VHH-6. Ningún control presentó ADN. Todas las secuencias detectadas en enfermos con EM pertenecieron a la variedad A de VHH-6.	¿Influye el diferente neurotropismo de las variedades de VHH-6 en la patogenia de la EM? En algunas placas activas de EM, el tejido presenta ADN del VHH-6. La detección de secuencias del VHH-6A en las CMSP de pacientes con EM puede relacionarse con la posible asociación entre EM e infección latente por VHH-6A en el SNC.
Rand y cols., 2000.	Pacientes con EM y un grupo control.	LCR.	Immunoblotting específico para determinar si EBNA-1 de VEB es la diana de las bandas oligoclonales presentes en el LCR de los pacientes con EM. Los índices de Acs se midieron mediante ELISA y se calcularon con la fórmula de Reiber y Lange.	Se observó un patrón de bandas EBNA-1 distinto en 5 de 51 pacientes con EM, no así en los 12 controles (p = 0,037, probabilidad exacta de Fisher).	El índice de Acs fue muy alto en este grupo comparado con los niveles observados en otras infecciones víricas del SNC. Los resultados obtenidos sugieren que en un subtipo de pacientes con EM, EBNA-1 puede ser la principal diana de las bandas seleccionadas

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Rotola y cols., 2000.	Pacientes con EM.	CMSP.	ARN _m de VHH-6 y VHH-7 mediante PCR.	Las secuencias víricas encontradas se mantienen sin transcribir.	No hay infección activa en las CMSP en estos pacientes.
Soldan y cols., 2000.	Pacientes con EM y controles.	Lisados celulares infectados con VHH-6A (U1102), VHH-6B (Z29) y VHH-7 (H75B).	Respuesta inmunoproliferativa de los lisados frente a diferentes cepas de VHH-6 y VHH-7.	Respuestas linfoproliferativas similares para los lisados de VHH-6B y VHH-7 en enfermos (78% y 28%) y controles (71% y 23%). Para el lisado de VHH-6A, la respuesta linfoproliferativa en los controles fue del 33%, frente al 67% de los enfermos con EM.	La respuesta linfoproliferativa frente a VHH-6A, cuyo neurotropismo es mayor, está incrementada en pacientes con EM.
Taus y cols., 2000.	Pacientes con EMRR.	Suero, LCR y CMSP.	IFI para IgG e IgM frente a VHH-6 (suero y LCR), PCR para ADN de VHH-6 y VHH-7 (LCR) y ADN de VHH-6 (CMSP).	No se detectó ADN vírico en ninguna muestra de LCR, y la frecuencia de ADN de VHH-6 CMSP no fue diferente de forma significativa entre los enfermos con EM y los controles. Tasas de Acs comparables a los de la población general.	Los datos sugieren que no hay relación entre VHH-6 ó VHH-7 y EM.

Tabla 3. Continuación.

Autor	Población	Muestras	Técnicas	Resultados	Comentarios
Wandinger y cols., 2000.	108 pacientes con EM y 163 controles sanos. Seguimiento mensual durante un año a 19 pacientes con EM.	Sueros.	ELISA y PCR.	Los anticuerpos frente a VEB presentes en el 100% de los enfermos con EM y en el 90,1% de los controles. La primoinfección fue detectada en un 3,7% de los controles sanos, y en ningún enfermo con EM. Incremento de la respuesta frente a IgM e IgA frente a los antígenos tempranos, y ADN del virus en el 72,7% de los pacientes con exacerbaciones durante el periodo de seguimiento, pero no en el suero de los pacientes con EM clínicamente estable.	La infección por VEB es un prerrequisito de la enfermedad. Concluyeron que la reactivación por VEB está implicada directamente en la patogénesis de la EM, lo que concuerda con los hallazgos que indican que las exacerbaciones de EM se reducen notablemente en pacientes tratados con aciclovir.

3. Enfermedad en hospedadores inmunocomprometidos

Las personas con su sistema inmune deteriorado presentan un mayor riesgo de sufrir manifestaciones clínicas debido a primoinfecciones o reactivaciones de una infección latente o persistente por herpes. La asociación entre la infección por VHH-6 y enfermedad en este tipo de pacientes se ha observado desde hace mucho tiempo, dado que en los receptores de TMO, riñón e hígado, se induce inmunosupresión por razones terapéuticas. En estos pacientes la infección o reactivación de la infección por VHH-6 puede producir supresión de médula ósea, neumonitis, encefalopatía, hepatitis, fiebre y rash cutáneo, que pueden culminar en rechazo y muerte (Braun y cols., 1997; Campadelli-Fiume y cols., 1999).

3.1. Trasplantes

VHH-6 se ha relacionado con la producción de enfermedades postrasplante (Braun y cols., 1997; Clark, 2000). La elevación de los anticuerpos frente a VHH-6 se ha relacionado en ocasiones con rechazo al trasplante renal (Okuno y cols., 1990_b; Jacobs y cols., 1994), incluso en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora, y en otros estudios (Merlino y cols., 1992; Yoshikawa y cols., 1992_a), no se relacionaron con el rechazo del riñón trasplantado. En un paciente sin infección activa por CMV se obtuvo cierta mejoría después del tratamiento con ganciclovir, de probada actividad *in vitro* anti-VHH-6 (Jacobs y cols., 1994). La variedad B fue más ampliamente detectada (PCR a partir de CMSP) e implicada como causa de los rechazos (Yalcin y cols., 1994_a) y los antígenos de VHH-6 (IHQ) se detectaron en muestras de biopsia renal con localización histológica concreta (células epiteliales del túbulo distal y linfocitos

infiltrantes del intersticio) principalmente en individuos que sufrieron rechazo agudo frente a los que sufrieron rechazo crónico (Hoshino y cols., 1995; Kurata y cols., 1990; Okuno y cols., 1990_b).

En los pacientes TMO, la actividad de VHH-6 se ha asociado a rash y enfermedad de rechazo del receptor frente al injerto (GVHD) (Appleton y cols., 1994; Cone y cols., 1993_b; Kadakia y cols., 1996; Michel y cols., 1994; Wang y cols., 1996; Yoshikawa y cols., 1991), neumonitis (Carrigan y cols., 1991; Carrigan y cols., 1992; Cone y cols., 1993_b; Cone y cols., 1994; Cone y cols., 1996; Gleaves y cols., 1985; Pitalia y cols., 1993; Ragona y cols., 1994), sinusitis (Kadakia y cols., 1996), episodios febriles (Drobyski y cols., 1993_a; Singh y cols., 1995) y supresión de la respuesta al injerto (Carrigan y cols., 1994; Drobyski y cols., 1993_a; Rosenfeld y cols., 1995). Es difícil encontrar asociación etiológica del virus con estos acontecimientos, pero en ausencia de otras posibles causas, podrían en última instancia ser consecuencia de la actividad de VHH-6 (Braun y cols., 1997). Alrededor del 90% de las cepas detectadas en TMO son de la variedad B (Drobyski y cols., 1993_b; Frenkel y cols., 1994; Kadakia y cols., 1996; Secchiero y cols., 1995_a; Wang y cols., 1996; Wilborn y cols., 1994_c), sola o asociada con VHH-6A.

La relación encontrada por muchos investigadores entre VHH-6 y GVHD y otros rashes dérmicos en TMO es interesante, pero no se ha establecido una relación causa-efecto de forma concluyente, a pesar de que la participación de otros agentes (CMV) en el desarrollo de GVHD es muy controvertida (Britt y cols., 1996).

En cuanto a la neumonitis en pacientes TMO, también es difícil establecer una relación etiológica con VHH-6, ya que se han aislado otros muchos patógenos

potenciales del tejido pulmonar, como CMV, adenovirus y *Aspergillus* (Carrigan y cols., 1992; Pitalia y cols., 1993). Alrededor del 90% de las cepas detectadas en TMO son de la variedad B (Drobyski y cols., 1993_b; Frenkel y cols., 1994; Kadakia y cols., 1996; Secchiero y cols., 1995_a; Wang y cols., 1996; Wilborn y cols., 1994_c).

En la mayoría de estudios realizados, la actividad de VHH-6 se monitoriza mediante cultivo rutinario de las CMSP durante un corto periodo después del trasplante y sólo cuando se asocia alguna manifestación clínica, como fiebre de origen desconocido (FOD).

En cuanto a los estudios de laboratorio, VHH-6 se puede aislar a partir de CMSP y médula ósea de muchos pacientes TMO (Carrigan y cols., 1991; Carrigan y cols., 1992; Drobyski y cols., 1993_b; Wyatt y cols., 1991) en los que se ha observado supresión de la médula ósea (Carrigan y cols., 1991; Drobyski y cols., 1993_a). Como mecanismos de VHH-6 para inducir supresión se han propuesto tanto la citólisis directa como la inhibición inducida por el virus, por supresión del factor de crecimiento y de maduración de las células precursoras de la médula ósea (Burd y cols., 1993; Carrigan y cols., 1995; Drobyski y cols., 1993_a, Knox y cols., 1992; Yamanishi y cols., 1992). Ambas variedades de VHH-6 pueden suprimir tales funciones *in vitro* (Carrigan y cols., 1995). Los estudios *in vitro* sobre el efecto supresor de VHH-6 sobre las células precursoras de la médula ósea implican a IFN- α (Kikuta y cols., 1990; Knox y cols., 1992), IL-3 (Burd y cols., 1993), TNF- α ó IL-1 β (Flamand y cols., 1995).

Existen estudios que demuestran que VHH-6 no se recupera de forma rutinaria de pacientes TMO sin seleccionar previamente, pero que a menudo se aísla a partir de la médula ósea de pacientes TMO que presentan supresión medular idiopática, no

demostrándose la asociación etiológica con ninguna de las dos variedades (Kadokia y cols., 1996). Sin embargo, los datos acumulados en los estudios *in vivo* e *in vitro* apoyan la posibilidad de que la actividad de VHH-6 contribuya a la supresión bajo algunas circunstancias.

Existe poca información disponible que considere la infección hepática en receptores de trasplante hepático ortotrópico (Ward y cols., 1989), pero se realizó un estudio serológico en un grupo de trasplantados cardiacos (Robert y cols., 1994) en el que se concluyó que la hepatitis postrasplante por VHH-6 no era un evento común.

3.2. Otros hospedadores sin VIH

Existen trabajos en los que se asocia el exantema en pacientes con LLA con la infección activa recurrente frente a VHH-6 (Fujita y cols., 1996), donde la falta de respuesta humoral significativa puede deberse a la inmunosupresión iatrogénica subyacente.

Se han descrito casos de neumonitis grave asociada a VHH-6 en individuos inmunodeprimidos sin causa aparente (VIH negativos y sin inmosupresión farmacológica de ningún tipo) (Prezioso y cols., 1992; Russler y cols., 1991). Se interpretó que la inmunosupresión idiopática o la infección pulmonar con otros microorganismos puede contribuir a la susceptibilidad de neumonitis asociada a VHH-6 (Braun y cols., 1997).

3.3. Sida

VHH-6 fue descrito desde un principio como causante de enfermedades en pacientes inmunodeprimidos. Después de comprobarse las interacciones *in vitro* entre

VHH-6 y VIH-1, se ha discutido mucho acerca de la existencia o no de enfermedad asociada a VHH-6 en pacientes VIH-1, y si la infección por VHH-6 influye o no en la progresión a sida (Chen y cols., 1992; Nigro y cols., 1995; Spira y cols., 1990). Sería interesante caracterizar las manifestaciones de VHH-6 en pacientes VIH-1, ya que aún no se incluye entre los indicadores de infecciones para el diagnóstico de sida (Fantry y cols., 1999).

En cuanto a la variedad de VHH-6 más ampliamente detectada, en Asia se ha detectado VHH-6A en linfoma no Hodgkin (NHL) asociado a infección por VIH (Fillet y cols., 1995), en adictos a drogas por vía parenteral (Jayavasudhara y cols., 1997) y en pacientes VIH sin linfoma (Iuliano y cols., 1997).

Con respecto a las manifestaciones clínicas de la infección por VHH-6 en el paciente VIH, se ha asociado con encefalopatía o encefalitis (Knox y cols., 1995; Saito y cols., 1995; Knox y cols., 1995), neumonitis (Cone y cols., 1994; Nigro y cols., 1995), retinitis asociada o no a CMV (Fillet y cols., 1996; Qavi y cols., 1994; Qavi y cols., 1995) y probablemente, fiebre y citopenia (Furlini y cols., 1996). Se ha comprobado que la infección por VHH-6 produce células progenitoras hematopoyéticas más susceptibles a la infección y replicación de VIH-1 *in vitro*, lo que indica que la coinfección *in vivo* puede inducir citopenia en células hematopoyéticas. (Fantry y cols., 1999).

También se ha propuesto la asociación entre VHH-6 y diversos tumores en pacientes VIH-1, como cáncer de cérvix en mujeres también infectadas con papilomavirus humano (Chen y cols., 1994; Garzino-Demo 1996) y quizás NHL (Dolcetti y cols., 1996; Fillet y cols., 1995).

Se ha observado que VHH-6 puede ser un cofactor en la progresión a sida. Primero, porque ciertos genes de VHH-6 activan *in vitro* la transcripción de LTR de VIH-1 (Di Luca y cols., 1991; Ensoli y cols., 1989; Horvat y cols., 1991; Kashanchi y cols., 1994; Mori y cols., 1998; Sieczkowski y cols., 1995; Thomson y cols., 1994; Wang y cols., 1996). Segundo, porque VHH-6 puede incrementar la expresión de CD4 en linfocitos T, lo que incrementa su susceptibilidad *in vitro* a la infección VIH-1 (Lusso y cols., 1995). Tercero, porque algunos datos sugieren que VHH-6 acelera el efecto citopático de VIH-1 (Mori y cols., 1998; Sieczkowski y cols., 1995; Takasaki y cols., 1997). Cuarto, porque también se ha observado que algunos pacientes con sida presentaban una infección activa por VHH-6 en el momento de su muerte (Knox y cols., 1996). Quinto, porque también se ha informado de la dramática pérdida de células CD4+ inmediata a la reactivación de la infección por VHH-6 en pacientes VIH-1 (Blázquez y cols., 1995; Iuliano y cols., 1997), aunque la asociación con inmunosupresión se ha puesto en tela de juicio, ya que VHH-6 también se ha detectado en pacientes VIH-1 con altos recuentos de CD4+ (Fairfax y cols., 1994; Nigro y cols., 1995). Para finalizar, también se ha observado que la variedad VHH-6A suprime funcionalmente la transformación de H-ras y la expresión de LTR de VIH-1 (Araujo y cols., 1995).

4. Neoplasias

4.1. Mecanismos moleculares

A favor del potencial carcinogénico de VHH-6 está la capacidad transformante de tres de sus fragmentos de ADN en líneas celulares de fibroblastos de ratón o queratinocitos epidérmicos humanos *in vitro*. Uno codifica la región DR7 (Kashanchi y

cols., 1997) y las otras dos ocupan las regiones comprendidas entre U2-U20 y U31-U37 (Razzaque y cols., 1990; Razzaque y cols., 1993; Thompson y cols., 1994). Los clones celulares resultantes fueron malignos y tumorígenos en ratones atímicos (Razzaque y cols., 1990; Thompson y cols., 1994). Estas tres regiones contienen genes con capacidad activante de LTR de VIH-1. Se han revisado las investigaciones moleculares y clínicas sobre VHH-6 y varios tipos de tumores (Braun y cols., 1997) con resultados controvertidos, principalmente porque no se han hallado criterios para establecer una asociación definitiva entre el virus y su potencial oncógeno (Campadelli-Fiume y cols., 1999).

4.2. Asociaciones clínicas: desórdenes linfoproliferativos

Las posibles asociaciones clínicas entre VHH-6 y enfermedad neoplásica se limitaron inicialmente a desórdenes linfoproliferativos, dado el linfotropismo de estos virus (Campadelli-Fiume y cols., 1999). La comparación de resultados entre estudios es complicada debido a las diferencias en cuanto a métodos de detección, sensibilidad, población estudiada, porcentaje de células tumorales respecto al total de masa celular examinada, etc. Los métodos de localización *in situ* son útiles para determinar el tipo celular que alberga al virus, pero su escasa sensibilidad comparada con la de la PCR, los hace poco fiables (Braun y cols., 1997).

4.2.1. Linfomas no Hodgkin

En ningún estudio se encontraron diferencias significativas en cuanto a la detección de ADN de VHH-6 entre pacientes con NHL relacionados o no con sida (Braun y cols., 1997; Corbellino y cols., 1993; Knox y cols., 1994), por lo que se

concluyó la escasa asociación etiológica entre VHH-6 y la mayoría de procesos cancerígenos (Braun y cols., 1997).

4.2.2. Enfermedad de Hodgkin

Existen múltiples trabajos que tratan de la posible patogenicidad de VHH-6 en HD (Braun y cols., 1997) con resultados muy dispares. Por analogía con VEB, las diferencias que se observaron en la frecuencia de detección de VHH-6 en muestras de pacientes HD, se pudieron deber a una gran variedad de factores (Braun y cols., 1997).

En cuanto a su mecanismo de acción, Krueger y cols. (1994) propusieron que VHH-6 puede contribuir al desarrollo de HD indirectamente por estimulación de la proliferación celular, así como por disrupción del control de citoquinas en la función y proliferación celulares.

Dolcetti y cols. (1996), en un estudio realizado en pacientes VIH-1 positivos, interpretaron la presencia de VHH-6 en las células malignas de HD de dos formas: primero, como una infección normal de VHH-6 en una fracción de los clones malignos (positivos además a VEB, de probada acción oncógena), y segundo, como un mero huésped de los linfocitos infiltrantes presentes en el tumor. Estos resultados contradicen el papel patogénico asignado a VHH-6 en la mayoría de los casos de HD relacionados con VIH.

Braun y cols. (1997) sugirieron un posible papel etiológico de VHH-6 en algunos pacientes con HD, por múltiples razones. Entre ellas, que la cantidad de ADN de VHH-6 en algunos tumores es tan grande que hace innecesario el empleo de técnicas de amplificación para su detección. Otra de las razones es que aproximadamente la mitad

de las muestras con PCR positiva frente a VHH-6 fueron negativas a la PCR específica frente a VEB en un mismo estudio. Ya que VHH-6 puede infectar a muchas células que son portadoras de VEB, se sugirió que el primero puede influir en la expresión de genes del segundo (Ablashi y cols., 1988; Flamand y cols., 1993), lo que habla a favor de asociaciones sinérgicas entre ambos virus. Otra razón expuesta es que algunos grupos de pacientes con HD presentan títulos elevados de anticuerpos frente a VHH-6, incluyendo pacientes que pueden poseer factores causales distintos de VEB (Alexander y cols., 1995).

Aunque ninguna de las evidencias acumuladas es definitiva, VHH-6 permanece como un potencial agente etiológico de la patogénesis de algunos casos de HD (Braun y cols., 1997).

4.2.3. Serología de VHH-6 en linfomas y leucemias

Existen discrepancias sobre la existencia o no de diferencias entre los títulos de anticuerpos en enfermos con NHL o HD frente al resto de la población (Levine y cols., 1992_a; Levine y cols., 1992_b; Torelli y cols., 1995; Clark y cols 1990; Alexander y cols., 1995). De todas formas, los datos serológicos deben interpretarse con cautela cuando se valoran las posibles asociaciones entre VHH-6 y desórdenes malignos, ya que VHH-6 puede infectar de forma latente o persistente las células neoplásicas, originando la expresión de antígenos víricos (Braun y cols., 1997). Aún así, no se han observado diferencias significativas entre los pacientes con LLA y controles (Clark y cols., 1990, Levine y cols., 1992_b), pero sí entre pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LAM) en comparación con los controles (Clark y cols., 1990).

Se han descrito tres ejemplos de pacientes con secuencias de VHH-6 integradas en el ADN de las CMSP (Luppi y cols., 1993_a; Luppi y cols., 1994_c; Torelli y cols., 1995). En cada uno, el título de IgM específica frente a VHH-6 fue negativo y el de IgG también fue prácticamente nulo.

El ADN de VHH-6 se detectó (en linfoblastos de médula ósea) en un alto porcentaje de pacientes con LLA de las células T (LLA-T) mediante hibridación (Luka y cols., 1991). El patrón de expresión de los genes víricos en estas células puede deberse a una infección latente o abortiva de los linfoblastos LLA-T. En otro estudio con pacientes con LLA-B y LLA-T (Barozzi y cols., 1995) todas las muestras en las que se detectó ADN de VHH-6 (por métodos distintos a la nested-PCR) pertenecían a pacientes con LLA-B. Los resultados similares entre pacientes con LLA y controles después de aplicar nested-PCR, concluyeron un improbable papel etiológico de VHH-6 en la LLA.

Las diferencias observadas entre estudios se deben a diferentes factores, como son el uso de células de médula ósea frente a CMSP y a la heterogeneidad entre las poblaciones con respecto a la distribución de la edad y el tipo de leucemia, por lo que el posible papel de VHH-6 en LLA-T permanece sin aclarar (Braun y cols., 1997).

4.3. Asociaciones clínicas con otras neoplasias

4.3.1. Sarcoma de Kaposi

El sarcoma de Kaposi es una neoplasia rara que inicialmente fue descrita en hombres ancianos del Mediterráneo (Di Giovanna y cols., 1981). Actualmente se conocen cuatro categorías clínicas del (KS): clásico o mediterráneo, endémico africano,

asociado a trasplantes o iatrogénico y epidémico o asociado a sida (Suga y cols., 1993). En varios estudios se buscó la posible asociación entre KS y VHH-6 (Bovenzi y cols., 1993; Kempf y cols., 1995; Luppi y cols., 1996) sin éxito (Braun y cols., 1997). La evidencia seroepidemiológica (Gao y cols., 1996_a; Gao y cols., 1996_b; Kedes y cols., 1996; Lannette y cols., 1996) y molecular (Ambroziak y cols., 1995; Chang y cols., 1994; Huang y cols., 1995; Moore y cols., 1995; Si y cols., 1995) acumulada es consecuente con el papel etiológico de VHH-8 en el KS.

4.3.2. Carcinoma oral

En un estudio reciente se detectaron ADN (PCR) y gp116/64/54 (IHQ) de VHH-6 en un elevado porcentaje de muestras de carcinoma oral (Yadav y cols., 1994). La glucoproteína no se halló en ningún control, ni tampoco en otro tipo de tumores (carcinoma nasofaríngeo). Los pacientes en estadio avanzado de carcinoma oral estudiados presentaron títulos elevados de IgA específica frente a VHH-6, mientras que los controles fueron negativos. Debido a esto se dedujo que es posible la asociación específica de VHH-6 en estado replicativo al carcinoma oral, posiblemente como cofactor.

4.3.3. Carcinoma cervical

En un estudio *in vitro* con líneas celulares de carcinoma cervical, Chen y cols. (1994) estudiaron muestras de biopsia de carcinoma cervical escamoso (SCC) o neoplasia intraepitelial en grado III (CIN III). Se detectó ADN de VHH-6 en el 8% de las muestras (nested PCR e hibridación blot), pero ninguna de las muestras de controles fue positiva a VHH-6. Zur Hausen y cols. (1991) detectaron que 4 de 6 muestras

positivas a VHH-6 (PCR) también lo fueron a papilomavirus humano tipo 16 (PVH-16). El ADN de VHH-6 (IHQ) en las lesiones típicas de CIN III o SCC no se localizó en los núcleos de células epiteliales cervicales, a diferencia del PVH-16. Estos resultados son compatibles con el mecanismo “hit and run” de VHH-6 como cofactor del PVH para causar daños en algunos casos de carcinoma cervical, o con la creencia de que VHH-6 es un hospedador ocasional de las células cervicales transformadas, lo que explicaría el bajo número de casos positivos.

4.4. Conclusiones del papel de VHH-6 en la oncogénesis

No existe una demostración concluyente de que VHH-6A o VHH-6B estén implicados causalmente en ningún tumor. Pero a pesar de ello, los datos de que se dispone sugieren que al menos para algunas neoplasias existe más que una asociación casual con estos virus.

5. Síndrome de fatiga crónica

En los últimos años se ha incrementado el interés por este tipo de síndrome (SFC), caracterizado por cansancio crónico o prolongado frecuentemente por un periodo superior a los seis meses (Fukuda y cols., 1994). A pesar de la vaguedad de la definición, se han enumerado muchas hipótesis para explicar su patología. Puede ser la secuela psicológica de una infección aguda en personas emocionalmente susceptibles (Demitrack y cols., 1994). Otra hipótesis asegura que el SFC se debe a una disfunción persistente del sistema inmune inducida por un agente infeccioso (Demitrack y cols., 1994; Mawle y cols., 1993). Otra hipótesis sugiere que SFC se deba a un desorden del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y que se manifiesta debido a un estrés físico

(infección) o emocional (Demitrack y cols., 1994), ya que las anormalidades de dicho eje se asocian con alteraciones del humor y del sueño, así como con disfunciones inmunes. Con frecuencia estas hipótesis coinciden en que el fenómeno desencadenante del SFC es una infección aguda.

En los años 80 se implicaron a varios agentes víricos (VEB, VHS, CMV, enterovirus, retrovirus) sin éxito. VHH-6 (Salahuddin y cols., 1992) se relacionó con una epidemia de SFC (Dorfmann y cols., 1986), aunque más tarde se sugirió que esta relación era infundada (Levine y cols., 1990). Los estudios de seroprevalencia y los títulos de anticuerpos en pacientes y controles han proporcionado resultados confusos (Ablashi y cols., 1988; Balachandran y cols., 1989; Buchwald y cols., 1990; Dale y cols., 1989; Gold y cols., 1990; Levine y cols., 1992_c; Marshall y cols., 1991; Read y cols., 1990; Sairenji y cols., 1995; Wakefield y cols., 1988).

Existen muchos informes que consideran la relación de VHH-6 con SFC fundamentándose en la presencia de su ADN en CMSP y en la seroprevalencia. (Di Luca y cols., 1995_b; Patniak y cols., 1995; Yalcin y cols., 1994_b). Pero los resultados obtenidos sugirieron que algunos enfermos de SFC presentan respuestas inmunes atípicas frente a VHH-6, indicativo de posible actividad vírica debida a la reactivación de una infección latente que puede deberse a un descontrol inmune, y no al contrario.

6. Enfermedades del colágeno vascular

Los datos disponibles hasta la fecha no sugieren relación etiológica alguna entre VHH-6 y estas enfermedades (Baboonian y cols., 1990; Krueger y cols., 1991_b; Ranger-Rogez y cols., 1995).

X. MODELOS ANIMALES

El desarrollo de un modelo animal experimental puede proporcionar un medio adecuado donde estudiar fenómenos de patogenicidad vírica, latencia, reactivación y métodos terapéuticos. Existen autores que afirman que muchas especies de primates producen anticuerpos frente a VHH-6 (Higashi y cols., 1989), aunque otros niegan este (Lusso y cols., 1990). Mediante técnicas de biología molecular (PCR) no se pudo detectar ADN de VHH-6 en las CMSP de la especie *Macaca nemestrina* (Lusso y cols., 1994), lo que señala que estos monos no están infectados por VHH-6 o por virus estrechamente relacionados.

Las CMSP de ciertas especies de primates se ha visto que eran susceptibles *in vitro* a la infección por VHH-6A y VHH-6B (Levy y cols., 1990c; Lusso y cols., 1990; Lusso y cols., 1994; Yalcin y cols., 1992). Los linfocitos T de chimpancés pueden infectarse simultáneamente por VHH-6 y el VIH-1 (Lusso y cols., 1990), observándose una citopatogenicidad acelerada en las células infectadas doblemente, en comparación con las que sólo portaban un tipo de virus. Los linfocitos de mono verde africano pueden infectarse productivamente por las dos variedades de VHH-6 y por el virus de inmunodeficiencia simia (SIV), lo que puede conducir a un incremento de la replicación de SIV en las células infectadas dualmente (Lusso y cols., 1994). Estos monos desarrollan un estado de inmunodeficiencia por SIV semejante al sida en los humanos, por lo que puede ser un modelo animal útil en el estudio de interacciones *in vivo* entre VHH-6 y un virus que conduzca a un estado semejante a sida.

Los ratones SCID con implantes de tejidos humanos (SCID-hu) proporcionan un modelo animal útil para estudiar la susceptibilidad de diferentes tipos de tejidos humanos a la infección por VHH-6. El uso de ratones SCID-hu puede facilitar el aislamiento de VHH-6 y proporcionar un modelo que permita el análisis de los diferentes aspectos de la interacción del virus con el hospedador. Los implantes con tejido hematopoyético humano pueden ser útiles en el estudio de la expresión de genes víricos específicos de variedad, lo cual contribuiría al entendimiento de las diferencias biológicas entre VHH-6A y VHH-6B.

XI. DIAGNÓSTICO

Se han desarrollado métodos para detectar tanto a los virus, a sus antígenos y ácidos nucleicos, como a sus anticuerpos. La interpretación de los resultados frente a VHH-6 es complicada por la elevada seroprevalencia y su presencia en las células sanguíneas. Se deben desarrollar ensayos sensibles y fiables que realmente discriminen infección activa de latente. Se están estudiando ensayos que demuestran asociaciones significativas entre un marcador vírico dado y cualquier enfermedad. Esto es útil para estudios epidemiológicos, ya que el punto de corte que permite una asociación definitiva entre VHH-6 y enfermedad no se ha definido. Los clínicos han de tener en cuenta que la presencia del virus en un determinado tejido no necesariamente indica asociación etiológica.

1. Detección del virus: diagnóstico directo

1.1. Cultivo

VHH-6 se puede cultivar a partir de linfocitos de un alto porcentaje de niños durante la fase febril previa al rash asociado a ES (Asano y cols., 1989_b; Asano y cols., 1991_a; Okada y cols., 1993; Yamanishi y cols., 1988). Es necesaria la activación de los linfocitos con fitohemaglutininas o anticuerpos frente a CD3 y el mantenimiento en IL-2. En la fase de exantema, el virus se detecta de forma poco frecuente en cultivos, aunque algunos aislamientos se han obtenido de estados de inmunosupresión tales como sida o trasplantes. El ES es la única entidad clínica donde el aislamiento del virus junto con la sintomatología permite el diagnóstico definitivo, pero es una práctica poco rentable, ya que la enfermedad se resuelve normalmente sin complicaciones.

1.2. Antígenos

Se pueden detectar por mAbs (Bapaty cols., 1989; Campadelli-Fiume y cols., 1993; Chandran y cols., 1992; Foà-Tomasi y cols., 1995; Iyengar y cols., 1991; Okuno y cols., 1990_a; Yamamoto y cols., 1990), algunos de ellos disponibles comercialmente. Varios de los mAbs pueden reaccionar con proteínas de las dos variedades, aunque otros son específicos de variedad (Foà-Tomasi y cols., 1995). Estos anticuerpos pueden usarse como reactivos en técnicas de inmunofluorescencia y en secciones de tejidos fijadas. La detección de los antígenos es útil para la confirmación del cultivo positivo y para la detección de la expresión de proteínas víricas en tejidos. Existe un enzimoimmunoensayo de captura comercial basado en la proteína gp116/64/54 que es útil frente a ambas variedades (Marsh y cols., 1996). La sensibilidad del ensayo es similar a la detección vírica a partir del cultivo de plasma de niños con ES; además es rentable en el diagnóstico diferencial rápido de niños con fiebre y para monitorizar la actividad vírica en receptores de trasplantes.

1.3. Ácidos nucleicos

Se pueden detectar por hibridación y PCR. La hibridación Southern blot es de utilidad en el cribaje rápido cuando el volumen de muestras es grande, aunque es una técnica menos sensible que la PCR, lo cual presenta tanto ventajas como inconvenientes. Por un lado, los resultados positivos no pueden correlacionarse con la actividad de VHH-6. Además, su baja sensibilidad puede conducir a falsas conclusiones sobre la presencia de ácidos nucleicos.

Se han descrito numerosos equipos de primers de PCR específicos y sensibles para VHH-6 (Asano y cols., 1990_a; Aubin y cols., 1991; Aubin y cols., 1993; Aubin y cols., 1994; Chow y cols., 1994; Collandre y cols., 1991; Cone y cols., 1993_a; Cone y cols., 1993_b; Huang y cols., 1992_a; Kido y cols., 1990; Klotman y cols., 1993; Kondo y cols., 1990; Kondo y cols., 1993; MacElhinney y cols., 1995; Prukasananonda y cols., 1992; Secchiero y cols., 1995_a; Yamamoto y cols., 1994). Algunos de ellos permiten la discriminación entre variedades (Aubin y cols., 1994; Chou y cols., 1994; Yamamoto y cols., 1994). Como inconveniente, la presencia de VHH-6 en la saliva del personal de laboratorio puede dar falsos positivos en los resultados de PCR si no se toman precauciones adecuadas (Cone y cols., 1990; Kelley y cols., 1994). Hasta la fecha, la mayoría de los estudios han empleado PCR cualitativa. Si se estudian grupos de control adecuados, los resultados pueden proporcionar una base para el estudio del papel del virus en una enfermedad dada de forma más rigurosa.

La detección de virus libre en suero o plasma por PCR ofrece la posibilidad de diagnosticar las infecciones activas de VHH-6. En diversos trabajos se ha detectado el ADN de VHH-6 en pacientes con ES, en receptores de TMO y en pacientes infectados por VIH, mientras que no se detectó ninguna variedad en ningún adulto sano (Huang y cols., 1992_a; Secchiero y cols., 1995_a). El periodo de recolección de muestras es crítico para la obtención de resultados: mientras que en la fase aguda los resultados positivos son bajos (30%), las muestras recolectadas entre 7 y 20 días después de la fase aguda son todas positivas (Huang y cols., 1992_a).

Se han perfeccionado las técnicas de PCR cuantitativa en los últimos años (Clark y cols., 1996; Cone y cols., 1993_a; Cone y cols., 1993_b; Secchiero y cols., 1995_c), ya que

son métodos para la amplificación y la cuantificación de genes específicos. Son útiles en aquellas muestras que previamente arrojaron un resultado positivo frente a una PCR estándar en enfermedades asociadas a tejidos.

2. Diagnóstico serológico

Los formatos de los inmunoensayos estándares se han adaptado para la detección de los anticuerpos frente a VHH-6; éstos incluyen IFA indirecto (Black y cols., 1989; Briggs y cols., 1988; Couillard y cols., 1992; Krueger y cols., 1991_a; Robert y cols., 1990), inmunofluorescencia anticomplementaria (Black y cols., 1989; López y cols., 1988), radioinmunoensayo (RIA) competitivo (Coyle y cols., 1992), neutralización (Asada y cols., 1989; Suga y cols., 1990_a) y EIA en placa de microtitulación (Asano y cols., 1990_a; Black y cols., 1996; Chou y cols., 1990; Dahl y cols., 1990; Iyengar y cols., 1991; Parker y cols., 1993; Saxinger y cols., 1988). Hay que considerar varios aspectos con respecto a estos ensayos, ya que no son capaces en su mayoría de discriminar entre las dos variedades, aunque hay excepciones (Chandran y cols., 1992), y además existe reactividad serológica cruzada entre VHH-6 y VHH-7 que puede dar falsos positivos (Black y cols., 1996). Cualquier resultado positivo tiene escaso valor predictivo de enfermedad, ya que casi toda la población es seropositiva a los dos años de edad.

La respuesta de IgM específica se interpreta frecuentemente como infección primaria (Suga y cols., 1992) o reactivación (Patnaik y cols., 1995), aunque la IgM por sí sola no proporciona una respuesta diagnóstica capaz de responder a cualquier entidad clínica definida.

3. Aplicación en el diagnóstico clínico

El problema que se plantea es el de la utilidad de los tests de laboratorio en el diagnóstico clínico y en el tratamiento de pacientes concretos.

3.1. Enfermedad febril y rash

Se pueden realizar cultivos y PCR a partir de CMSP y ensayos serológicos a partir de muestras de suero en paralelo separados al menos una semana, para proporcionar la mayor evidencia directa de actividad de VHH-6. Para los pacientes con ES clásico no es rentable el empleo de otros tests aparte de la observación de la clínica. Un test de antigenemia o una PCR rápida serían útiles para el diagnóstico diferencial de los casos de infección primaria por VHH-6 en pacientes sin las manifestaciones típicas de ES de otras enfermedades con fiebre o exantemas y evitar así el uso inapropiado de antibióticos para la prevención de la extensión de las resistencias bacterianas.

3.2. Enfermedad neurológica aguda

La PCR del LCR se ha empleado en el diagnóstico de enfermedades neurológicas agudas asociadas a VHH-6 (Asano y cols., 1991_a; Kondo y cols., 1993; Suga y cols., 1993; Yoshikawa y cols., 1992_c). Sería útil una PCR del LCR para el diagnóstico de las convulsiones febriles asociadas a VHH-6 (Barone y cols., 1995; Hall y cols., 1994; Ward y cols., 1994) y en el diagnóstico diferencial de otras enfermedades. La confirmación puede hacerse por comparación serológica de muestras entre la fase aguda y convaleciente o por el hallazgo de anticuerpos de baja afinidad frente a VHH-6 en muestras de la fase aguda, lo que sugiere infección primaria (Ward y cols., 1993). También puede ser rentable en pacientes con episodios febriles recurrentes asociados a

VHH-6, como describen Kondo y cols. (1993), ya que estos individuos pueden ser candidatos a la terapia antivírica. Estos criterios no son posiblemente aplicables en los primeros episodios febriles, porque la autolimitación a largo plazo es la regla general para la mayoría de los niños con convulsiones febriles. Otros pacientes que se pueden beneficiar de esta técnica rápida de diagnóstico son los que presentan enfermedad sugerente de encefalitis vírica. Las encefalitis por VHS a menudo se tratan con aciclovir intravenoso en base a datos clínicos y radiológicos, empleando técnicas invasivas de diagnóstico. La determinación de antígenos específicos de VHH-6 por tinción de IHQ de biopsia *in situ* puede ser una técnica alternativa y sugerir el empleo de agentes antivíricos activos frente a VHH-6, ya que la PCR positiva frente a VHH-6 en LCR permanece largo tiempo después de la primoinfección y puede no ser apropiada para diagnosticar encefalitis asociada a VHH-6 (Caserta y cols., 1994).

3.3. Otras

Para otras enfermedades asociadas a VHH-6, se aconsejan otros métodos junto con el cultivo: PCR de suero o plasma, EIA de captura de antígenos, PCR del tejido afectado, IHQ *in situ*, tests serológicos (IgM e IgG en muestras paralelas). En general, el diagnóstico definitivo de las enfermedades relacionadas con VHH-6 distintas del ES requiere un mayor rigor de los ensayos y desarrollo y expansión de las bases de datos para permitir su interpretación.

XII. TRATAMIENTO

Se ha observado la actividad *in vitro* de diversos antivíricos frente a VHH-6 (Williams y cols., 1992). La mayoría son inhibidores de la ADN polimerasa, como el ácido fosfonoacético (Di Luca y cols., 1990; Shiraki y cols., 1989), fosfonoformato o foscarnet (Agut y cols., 1989_a; Burns y cols., 1990; Streicher y cols., 1988), aciclovir (Agut y cols., 1989_b; Agut y cols., 1991; Bapat y cols., 1989; Burns y cols., 1990; Di Luca y cols., 1990; Kikuta y cols., 1989_b; Russler y cols., 1989; Streicher y cols., 1988) y ganciclovir (Agut y cols., 1989_b; Agut y cols., 1991; Burns y cols., 1990; Russler y cols., 1989). Los resultados entre los diferentes estudios no son comparables debido a las diferencias metodológicas entre los mismos y a las diferentes líneas celulares y cepas víricas empleadas. A pesar de estas limitaciones, los datos indican mayor susceptibilidad de VHH-6B frente al ganciclovir y foscarnet que frente al aciclovir, el cual inhibe la replicación vírica sólo a elevadas concentraciones, patrón similar al de CMV. La susceptibilidad de VHH-6A a ganciclovir y foscarnet es semejante a la de VHH-6B. Pero en otros estudios se ha visto que las cepas SIE y TAN de VHH-6A son susceptibles al ganciclovir (Agut y cols., 1989_b; Agut y cols., 1991) mientras que otras cepas (GS) son relativamente resistentes (Akesson-Johansson y cols., 1990, Streicher y cols., 1988). De ahí se dedujo que los casos en que la variedad infectante sea desconocida, el foscarnet puede ser preferible al ganciclovir. El ácido fosfonoacético también inhibe a VHH-6B (Z29) (Burns y cols., 1990; Di Luca y cols., 1990; Shiraki y cols., 1989), pero no se ha estudiado su actividad frente a otras cepas de VHH-6. La hidrocortisona y la dexametasona han mostrado tanto incremento como supresión,

respectivamente, de la replicación *in vitro* de VHH-6 (Black y cols., 1989; Russler y cols., 1991).

Existen pocos artículos que describan el uso en humanos de antivíricos para al tratamiento de las enfermedades relacionadas con VHH-6. En TMO se resolvió con éxito la viremia atribuida a VHH-6 con ganciclovir (Drobyski y cols., 1993_a). La terapia con ganciclovir también se ha asociado a la resolución del rechazo al trasplante renal alogénico en un paciente con títulos elevados de IgM frente a VHH-6 y sin evidencia de infección activa por CMV (Jacobs y cols., 1994). El foscarnet se ha mostrado más eficaz que el ganciclovir en el tratamiento de la viremia en algunos pacientes TMO, ya que tras la terapia con el primero se produjo el cuádruplo de cambios en el resultado de la PCR a partir de CMSP (de positivo a negativo) que con el segundo (Wang y cols., 1996).

La eficacia de los fármacos antivíricos frente a la infección por VHH-6 no se ha evaluado en ensayos controlados. Sin embargo, la obtención de datos definitivos que demuestren la eficacia de ciertos antivíricos de uso común puede ser difícil por las siguientes razones: (1) el fármaco antiherpético menos tóxico, el aciclovir, tiene un escaso efecto *in vitro* sobre VHH-6 cuando se emplea a concentraciones clínicas; (2) los niños con infecciones primarias no se consideran buenos candidatos para el tratamiento con agentes tales como ganciclovir o foscarnet debido a la naturaleza generalmente benigna de la enfermedad y la toxicidad asociada a estos fármacos; (3) los pacientes inmunocomprometidos (trasplante renal, TMO, sida avanzado) frecuentemente presentan enfermedades complejas con múltiples patógenos localizados en varios órganos (VHS y CMV) que también pueden inhibirse por la terapia antivírica, haciendo que la evaluación de la respuesta observada sea difícil con respecto a un agente

infeccioso (VHH-6) particular, además de que la relación etiológica entre VHH-6 y una enfermedad orgánica terminal no está claramente delimitada en estos enfermos.

A pesar de estas dificultades potenciales, se han identificado tres situaciones en las que la monitorización de la terapia antivírica para las infecciones de VHH-6 debe considerarse: receptores de trasplantes con neumonitis idiopática, pacientes con encefalitis asociada a VHH-6 y pacientes con EM. Estos últimos presentan la suficiente morbimortalidad como para garantizar el uso de agentes antivíricos. El foscarnet puede ser mejor candidato que el ganciclovir para determinar la actividad anti-VHH-6 *in vivo*, ya que inhibe el crecimiento de ambas variedades de VHH-6 *in vitro* y presenta mayor biodisponibilidad en el LCR (Agut y cols., 1989_a; Burns y cols., 1990; Hengge y cols., 1993). El estudio retrospectivo de pacientes con EM tratados con antivíricos frente a CMV o VHS puede proporcionar otra fuente de información útil, aunque no puede sustituir a un ensayo prospectivo bien controlado. El desarrollo de potentes agentes antivíricos mucho menos tóxicos puede incrementar la capacidad de evaluación de enfermedad asociada a VHH-6.

El sulfato de amantidina, una sustancia potencialmente útil en el tratamiento y la profilaxis de las infecciones víricas, se ha demostrado eficaz frente a los síntomas de la enfermedad de Parkinson, la dependencia a la cocaína y en el tratamiento de la apatía en los pacientes con EM (Ferszt y cols., 1999).

La capacidad para identificar déficits neurológicos de forma precoz en EM permitiría la intervención terapéutica que frenara o eliminara la progresión hacia la disfunción permanente. Esto se lleva a cabo mediante ensayos funcionales cuantitativos y objetivos con ratones que empiezan a padecer enfermedad desmielinizante por el

virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV-IDD) (McGavern y cols., 1999). Asimismo, la buena caracterización de la patogénesis de la EM posibilitaría la adopción de terapias inmunológicas apropiadas (Liblau y cols., 1999).

La terapia con IFN- β se emplea actualmente en el tratamiento de la EM, avalada por los resultados satisfactorios que se han obtenido en modelos animales con encefalitis autoinmune experimental, mediante el empleo de vectores víricos o plásmidos con genes de citoquina, que se inoculan en sangre, en las células T circulantes o en el SNC (Martino y cols., 2000).

En modelos animales (ratones de la cepa SJL/J) en los que se indujo enfermedad desmielinizante por TMEV, se ha estudiado el efecto que provocan las altas dosis (vía intraperitoneal) de IgG murina frente a este virus. Los resultados fueron esperanzadores: logró suprimirse la enfermedad tanto clínica como histológicamente de forma significativa ($p < 0,01$), reduciéndose el número de linfocitos productores de TNF- α . Actuaciones similares podrían ser una alternativa en el tratamiento de las exacerbaciones de la EM (Koh y cols., 2000).

La meta actual en el tratamiento de EM consiste en la remielinización y la protección de los axones dañados para incrementar la velocidad de conducción y atenuar los déficits neurológicos. En este sentido, las estrategias se dirigen hacia el trasplante de oligodendrocitos o el reclutamiento de células mielinizantes endógenas. Se han aislado dos mAbs humanos dirigidos frente a los antígenos de superficie de los oligodendrocitos que promovieron de forma significativa la remielinización en un modelo vírico de EM. Además, la dirección de mAbs humanos hacia áreas dañadas del SNC puede facilitar la opsonización de los restos de mielina, lo cual permitiría la

reparación. Por todo ello se dedujo que no todos los mAbs dirigidos frente a los oligodendrocitos son necesariamente patógenos (Warrington y cols., 2000).

También existen estudios en los que se refleja la influencia de las subclases de células T en las susceptibilidad o resistencia a la desmielinización en los modelos animales TMEV-IDD. Existe una correlación entre fenotipo de la enfermedad y genes V β , presentándose una gran cantidad de células T V β 8+ (protectoras de la desmielinización) en ratones que expresan el haplotipo susceptible H-2 (Drescher y cols., 2000_b).

No hace mucho que se ha comprobado que el IFN de tipo I reduce la tasa y la gravedad de las exacerbaciones de la enfermedad en ratones SJL/J con TMEV-IDD. El tratamiento a corto plazo con IFN- α/β triplica la remielinización de la materia blanca de la médula espinal en comparación con los controles. En cambio, el tratamiento a largo plazo duplica la extensión de la desmielinización. Se ha propuesto un mecanismo inmunomodulador para el IFN- α/β sobre la materia blanca dañada, ya que los ratones tratados presentaron altos niveles de IgG anti-TMEV en el suero y descenso del número de linfocitos B y T infiltrantes en el SNC. No se halló correlación entre el nivel de anticuerpos frente al IFN- α/β y la extensión de la desmielinización o remielinización. Estos resultados mostraron que el tratamiento con IFN- α/β puede presentar efectos paradójicos sobre la remielinización y la desmielinización (Njenga y cols., 2000).

Otros trabajos han demostrado que la respuesta inmune dependiente del receptor CD40 participa en la patogénesis de la enfermedad por TMEV en ratones SJL/J en la materia blanca del cerebelo y de la médula espinal, pero protege el *striatum*. Además, el

receptor CD40 se necesita para mantener la resistencia a la desmielinización y las disfunciones neurológicas en los ratones H-2b, y las interacciones mediadas por CD40 son necesarias, entre otras cosas, para la remielinización espontánea de la materia blanca de la médula espinal (Drescher y cols., 2000_a).

Los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4) son moduladores potenciales de la respuesta inmune del fenotipo Th1 frente al Th2, y por lo tanto, se pueden considerar candidatos terapéuticos para los desórdenes autoinmunes mediados por Th1. La combinación de inhibidores de PDE4 y PDE3 presenta efectos sinérgicos que pueden ampliar el espectro terapéutico. También se observó una sensibilidad diferencial en la inhibición de la PDE en células T autorreactivas frente a células T específicas de antígeno procedentes de pacientes con EM frente a controles. Esto sugiere que la inhibición de la PDE debilita el poder de estímulo de las células T y corrige el efecto de las citoquinas asociadas a la enfermedad subyacente en los desórdenes mediados por estas células, por lo que los inhibidores de la PDE podrían emplearse en el tratamiento de estas enfermedades autoinmunes (Bielekova y cols., 2000).

El tratamiento con mAbs frente a B7-1 y B7-2, moléculas coestimuladoras en la activación de las células T, suprime de forma significativa el desarrollo de la TMEV-IDD, tanto clínica como histológicamente. En los ratones tratados con mAbs frente a B7-1, se redujo la producción esplénica de TNF- α y de IFN- γ . En cambio, el tratamiento con mAbs frente a B7-2, no produjo efectos TMEV-IDD. Esto sugiere que B7-1 está involucrado en la patogénesis de TMEV-IDD y podría emplearse en el tratamiento de la EM (Inoue y cols., 1999).

Resumiendo, la mayoría de las infecciones por VHH-6, generalmente se resuelven de forma espontánea y no requieren tratamiento específico. Sin embargo, existe una serie de situaciones especiales (entre las que se encuentra la EM) en las que sería interesante la identificación de la terapia antivírica más eficaz, mediante el desarrollo de ensayos clínicos bien diseñados y aplicados sobre grupos de población adecuados. Asimismo, el conocimiento de los diferentes mecanismos patogénicos de la EM facilitaría la adopción de los tratamientos inmunológicos y antivíricos más convenientes, incluso la posible aplicación de medidas preventivas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Desde hace algún tiempo se sugiere que la causa de la destrucción de la mielina en los enfermos de esclerosis múltiple (EM) pudiera ser infecciosa, concretamente vírica, tal y como se refleja en la tabla 4. Como primera condición para estos estudios epidemiológicos señalan que es necesaria la infección previa por el virus durante la infancia para que actúe como agente desencadenante de la EM (Braun y cols., 1997). En segundo lugar, los estudios realizados en modelos animales sugirieron que ciertos virus pueden producir enfermedad tras un largo periodo de incubación, con cursos recidivantes y remitentes, así como destrucción de mielina por diversos mecanismos (Braun y cols., 1997), tal y como ocurre con la EM. Apoyando este hecho, los estudios realizados en pacientes con EM muestran mayores tasas de anticuerpos frente a ciertos virus, entre ellos VHH-6 (Braun y cols., 1997; Izquierdo y cols., 1990; Soldan y cols., 1997).

A modo de ejemplo, existe un estudio realizado por Soldan y cols. (1997) en el que se investigó la asociación entre VHH-6 con la EM detectando la presencia de IgM frente al antígeno temprano p41/38 de VHH-6 y su ADN en suero. Concluyeron, no sin ciertas reservas, que VHH-6 pudiera estar implicado en la etiopatogenia de la EM por múltiples razones:

1ª) La infección primaria generalmente ocurre durante los primeros dos años de vida, lo cual concuerda con la epidemiología de la EM, que tradicionalmente sugiere una exposición frente a un agente etiológico durante la infancia.

2ª) Los virus herpes en general son muy neurotrópicos. Así lo confirman los hallazgos de las proteínas de VHH-6 en oligodendrocitos incluidos en las lesiones de EM.

Tabla 4. Virus recuperados a partir de pacientes con esclerosis múltiple (modificado a partir de Johnson RT, 1994).

Virus	Método de aislamiento	Año
Rabia	<i>Encefalitis en ratones inoculados con cerebro o sangre.</i>	1946
Herpes simple	<i>Cambios citopáticos en cultivo celular inoculado con homogeneizado de cerebro.</i>	1964
Agente del scrapie	<i>Desarrollo del scrapie en ovejas 16-21 meses después de ser inoculadas con cerebro.</i>	1964
Agente asociado a esclerosis múltiple	<i>Descenso de los PMN en ratones inoculados con tejidos de EM.</i>	1972
Parainfluenza 1	<i>Cultivos celulares de tejido cerebral de 2 pacientes junto con otras células, y recuperación del virus.</i>	1972
Sarampión	<i>Cambios citopáticos en células de mono inoculadas con homogeneizado de biopsia cerebral.</i>	1972
Virus simio 5	<i>Formación de sincitios en cultivos celulares MRC5 inoculados células de médula ósea.</i>	1978
Citomegalovirus simio	<i>Desarrollo de parálisis en chimpancé a los 3 años de ser inoculado con células cerebrales de un paciente.</i>	1979
Coronavirus	<i>Cerebros frescos sin congelar inoculados en ratones y crecimiento en cultivo de los virus producidos.</i>	1980
Virus SMON-like*	<i>Cambios citopáticos en MRC5 inoculadas con LCR.</i>	1982
Flavivirus de la encefalitis transmitida por garrapatas	<i>Sangre de 2 pacientes inoculada intracelularmente a ratones.</i>	1982
HTLV-I	<i>ARN identificado en células T de LCR.</i>	1986
Retrovirus LM7	<i>Encontrado en líneas celulares de leptomeninge a partir de LCR.</i>	1989
VHS-1	<i>Aislado del LCR durante el primer ataque.</i>	1989
VHH-6	<i>Recuperados a partir de los CMSP de enfermos por PCR.</i>	1996

3ª) Una de las propiedades principales de los virus herpes es su tendencia a la reactivación. Los mismos factores que reactivan a estos virus (estrés o infección con otros agentes) también se han asociado con las exacerbaciones de la EM.

4ª) Aunque VHH-6 es un virus predominantemente linfotrópico de las células T, también se ha visto que infecta a otras células de origen linfoide y no linfoide. Un virus tan pleiotrópico como VHH-6, que puede infectar tanto células inmunes como nerviosas, podría explicar las anormalidades presentes en ambos tipos celulares en los enfermos con EM.

Si VHH-6 es el agente causal de la EM o si la presencia en el suero de ADN de VHH-6 y de elevados títulos de anticuerpos son un mero fenómeno acompañante de EM aún no se ha determinado. Además, otros herpesvirus, como VEB, se han relacionado con este proceso (Wandinger y cols., 2000).

Debido a que no está definitivamente establecido el papel que algunos virus herpes tienen en la aparición o en la reactivación de la EM en el tiempo, en este trabajo se realizan aportaciones, fundamentalmente serológicas, sobre la participación que estos agentes puedan tener, con los siguientes objetivos:

- Estudiar la presencia de ADN de VHH-6 en sueros y LCR de enfermos con esclerosis múltiple.
- Analizar la respuesta de anticuerpos frente a VHH-6, CMV y VEB en enfermos con esclerosis múltiple y compararlos con un grupo control.
- Evaluar la relación entre la coinfección por VHH-6, CMV y VEB en los enfermos con esclerosis múltiple.

- Por último, realizar un seguimiento serológico en enfermos con esclerosis múltiple para ver cómo varían en el tiempo los niveles de anticuerpos frente a VHH-6.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

Se analizaron un total de 211 muestras (139 sueros y 72 LCR) pertenecientes a pacientes estudiados en el Hospital Universitario Carlos Haya de Málaga y Hospital Universitario San Cecilio de Granada, agrupadas según los siguientes criterios:

GRUPO I.- Formado por 41 sujetos (41 sueros y 41 LCR), 23 mujeres y 18 hombres, con EM (32 remitente-recidivante, 5 progresiva secundaria y 4 progresiva primaria) con una media de edad de $39,2 \pm 12,7$ años (tabla 5, figuras 5 y 6) y un tiempo medio de evolución de $8,9 \pm 8,1$ años.

GRUPO II.- Formado por 31 individuos (31 sueros y 31 LCR), 18 mujeres y 13 hombres, con una media de edad de $48,2 \pm 16,2$ años, con otras enfermedades neurológicas (OEN; 6 con hipertensión intracraneal benigna, 3 con esclerosis lateral amiotrófica, 7 con accidentes cerebrovasculares, 3 con síndrome de Guillain-Barré, 7 con epilepsia, 2 con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, 2 con demencia y 1 con neurolúes) que fueron utilizados como grupo control (tabla 6, figuras 5 y 7).

GRUPO III.- Formado por 27 enfermos con EM (15 remitente-recidivante y 12 progresiva secundaria; figura 6), 17 de ellos nuevos y pertenecientes al Hospital Universitario San Cecilio, 15 hombres y 12 mujeres (figura 5), con una media de edad de 35 ± 10 años y un tiempo medio de evolución de $9 \pm 8,3$ años, en los que se hizo un seguimiento clínico y serológico. De ellos se obtuvieron entre dos y cuatro muestras por enfermo en fase aguda de EM, procesándose 67 sueros en total. Su distribución en el tiempo se refleja en la tabla 7.

En las muestras de los grupos I y II se investigó la presencia de IgG, IgM e IgA anti-VHH-6, IgG e IgA anti-CMV y anti-VEB, y el ADN de VHH-6. Cuando se detectaron anticuerpos en el LCR se investigó la concentración de proteínas y células para excluir la posibilidad de ruptura de la barrera hematoencefálica (punto de corte: $\leq 0,45$ mg de proteínas / dl y ≤ 5 células / μ l, respectivamente). En el suero de los enfermos del grupo III se investigó la presencia de IgG, IgM e IgA anti-VHH-6.

No se halló diferencia estadística entre las edades de los grupos ($p = 0,085$; T de Student).

Tabla 5. Formas clínicas de los enfermos con EM.

FORMA CLÍNICA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Remitente recidivante</i>	32	78,0
<i>Progresiva secundaria</i>	5	12,2
<i>Progresiva primaria</i>	4	9,8
TOTAL	41	100

Tabla 6. Diagnóstico de los individuos con OEN del grupo control.

DIAGNÓSTICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Hipertensión intracraneal benigna</i>	6	19,3
<i>Accidente cerebrovascular</i>	7	22,6
<i>Síndrome de Guillain-Barré</i>	3	9,7
<i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>	3	9,7
<i>Epilepsia</i>	7	22,6
<i>Otros</i>	5	16,1
TOTAL	31	100

Figura 5. Distribución de los individuos del estudio por sexos.

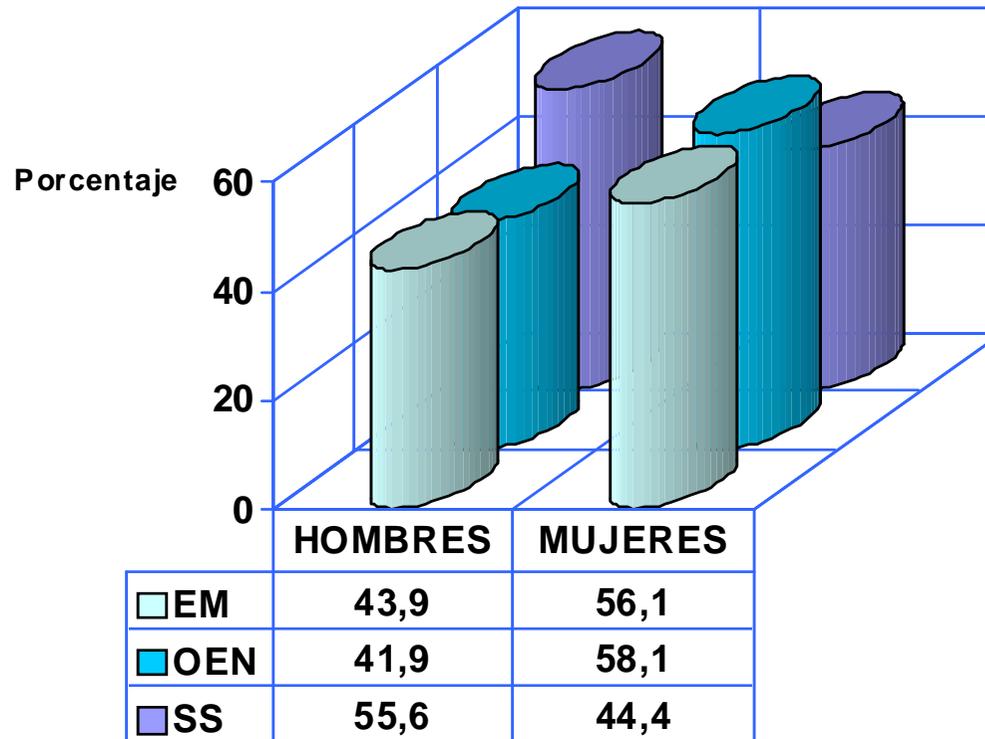


Figura 6. Distribución de los enfermos con EM según la forma clínica.

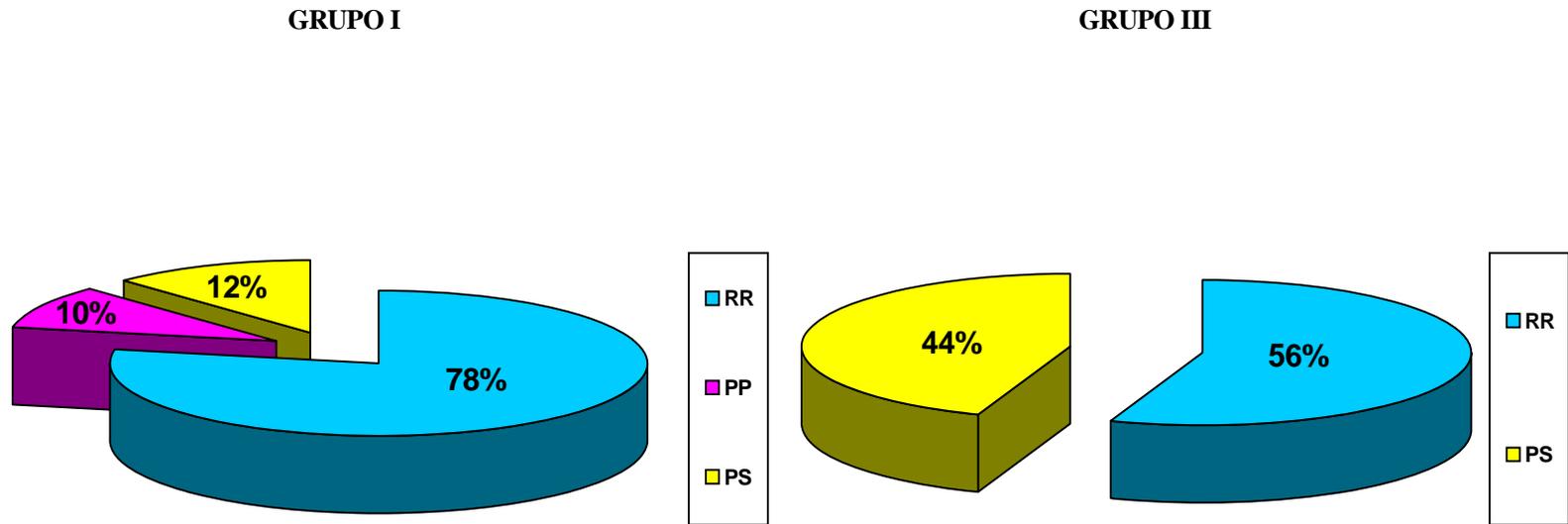


Figura 7. Distribución de los controles según la enfermedad neurológica.

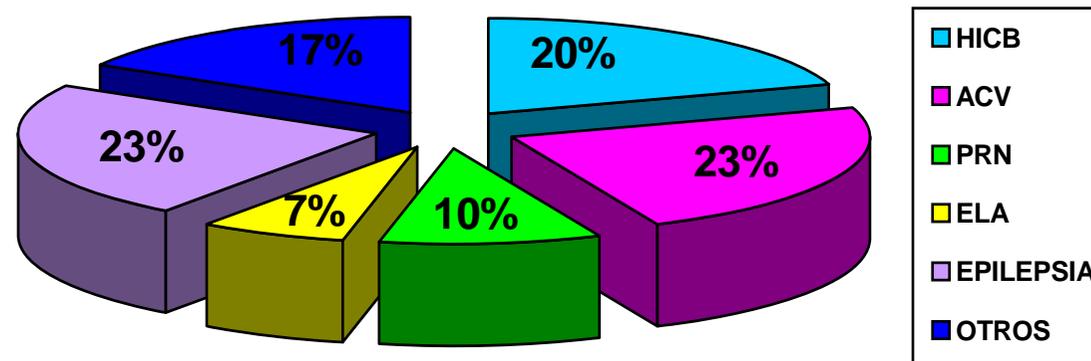


Tabla 7. Distribución en el tiempo de los sueros extraídos para el seguimiento de anticuerpos anti-VHH-6 en enfermos de EM (Grupo III).

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	CLÍNICA	FECHA DE EXTRACCIÓN
3-339	1	2	MAAC	RR	4-11-98
3-457					4-2-99
3-327	2	3	MCAR	RR	30-10-98
3-429					20-1-99
3-554					16-4-99
3-343	3	2	MABM	RR	4-11-98
3-493					2-3-99
3-413	4	2	JBP	PS	26-11-98
3-525					10-3-99
3-331	5	2	SCT	RR	3-11-98
3-582					23-4-99
3-373	6	3	DCI	RR	11-11-98
3-437					28-1-98
3-602					29-4-99
3-323	7	3	MJCC	PS	20-10-98
3-433					22-1-99
3-549					15-4-99
3-354	8	3	JGZ	PS	4-11-98
3-485					11-2-99
3-586					23-4-99
3-381	9	3	AHH	RR	11-11-98
3-473					9-2-99
3-578					22-4-99
3-318	10	2	MJLG	RR	22-10-98
3-425					20-1-99
3-521	11	2	JML	PS	9-3-99
3-393					13-11-98

Tabla 7. Continuación.

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	CLÍNICA	FECHA DE EXTRACCIÓN
3-389	12	2	RMP	RR	12-11-98
3-497					4-3-99
3-409	13	2	JMB	RR	24-11-98
3-517					9-3-99
3-365	14	4	MJMM	PS	6-11-98
3-405					23-11-99
3-421					16-12-98
3-533					16-3-99
3-450	15	2	ANE	PS	2-2-99
3-559					16-4-99
3-351	16	2	ROP	PS	4-11-98
3-445					2-2-99
3-453	17	2	MCOG	PS	4-2-99
3-594					27-4-99
3-385	18	3	MPT	RR	11-11-98
3-489					15-2-99
3-570					21-4-99
3-401	19	2	MJPC	PS	17-11-98
3-513					9-3-99
3-417	20	2	CPG	RR	30-11-98
3-509					8-3-99
3-574	21	3	APD	RR	22-4-99
3-357					5-11-98
3-465					5-2-99
3-377	22	3	VRR	RR	11-11-98
3-469					8-2-99
3-606					29-4-99

Tabla 7. Continuación.

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	CLÍNICA	FECHA DE EXTRACCIÓN
3-397	23	4	ARP	PS	13-11-98
3-476					9-2-99
3-477					9-2-99
3-590					27-4-99
3-361	24	3	ARF	PS	6-11-98
3-461					4-2-99
3-562					20-4-99
3-481	25	2	IRC	RR	10-2-99
3-545					13-4-99
3-313	26	2	YRG	RR	21-10-98
3-537					17-3-99
3-347	27	2	TVM	PS	4-11-98
3-501					5-3-99

II. MÉTODOS

1. Investigación de ácidos nucleicos de VHH-6

La detección del genoma de VHH-6 se llevó a cabo en todas las muestras de los grupos I y II mediante una PCR comercial (Herplex®, Pharmagen, Madrid) que amplifica una secuencia de 194 pb del gen de la ADN polimerasa vírica. Este ensayo incluye como control interno de amplificación una secuencia de 720 pb del ADN del virus de Aujeszky (Tenorio y cols., 1993).

Condiciones generales de la PCR.- Para prevenir la posible contaminación y los falsos resultados positivos se debieron tomar muchas precauciones en cada paso del ensayo; la premezcla de los reactivos, la extracción del ADN, la amplificación y la detección, fueron realizados en estancias diferentes. Las batas, las pipetas, las puntas anti-aerosoles, los tubos y los reactivos fueron mantenidos en cada habitación. Se hicieron cambios de guantes con frecuencia. Durante la adición del ADN a los tubos de amplificación, se emplearon mascarillas faciales. Los controles negativos incluyeron un control libre de ADN (H₂O bidestilada estéril), los controles positivos internos incluyeron un ADN diferente al de VHH-6 (gen del virus de Aujeszky) y los controles positivos externos contenían el genoma purificado de VHH-6. Al menos dos controles negativos se emplearon para el análisis de cada 10 muestras clínicas. Para prevenir los falsos negativos, las premezclas de los reactivos de amplificación fueron alicuotadas, y los extractos de ADN que dieron resultados negativos, fueron analizados de nuevo tras añadir el genoma purificado de VHH-6 para detectar los inhibidores de la PCR (Cone y

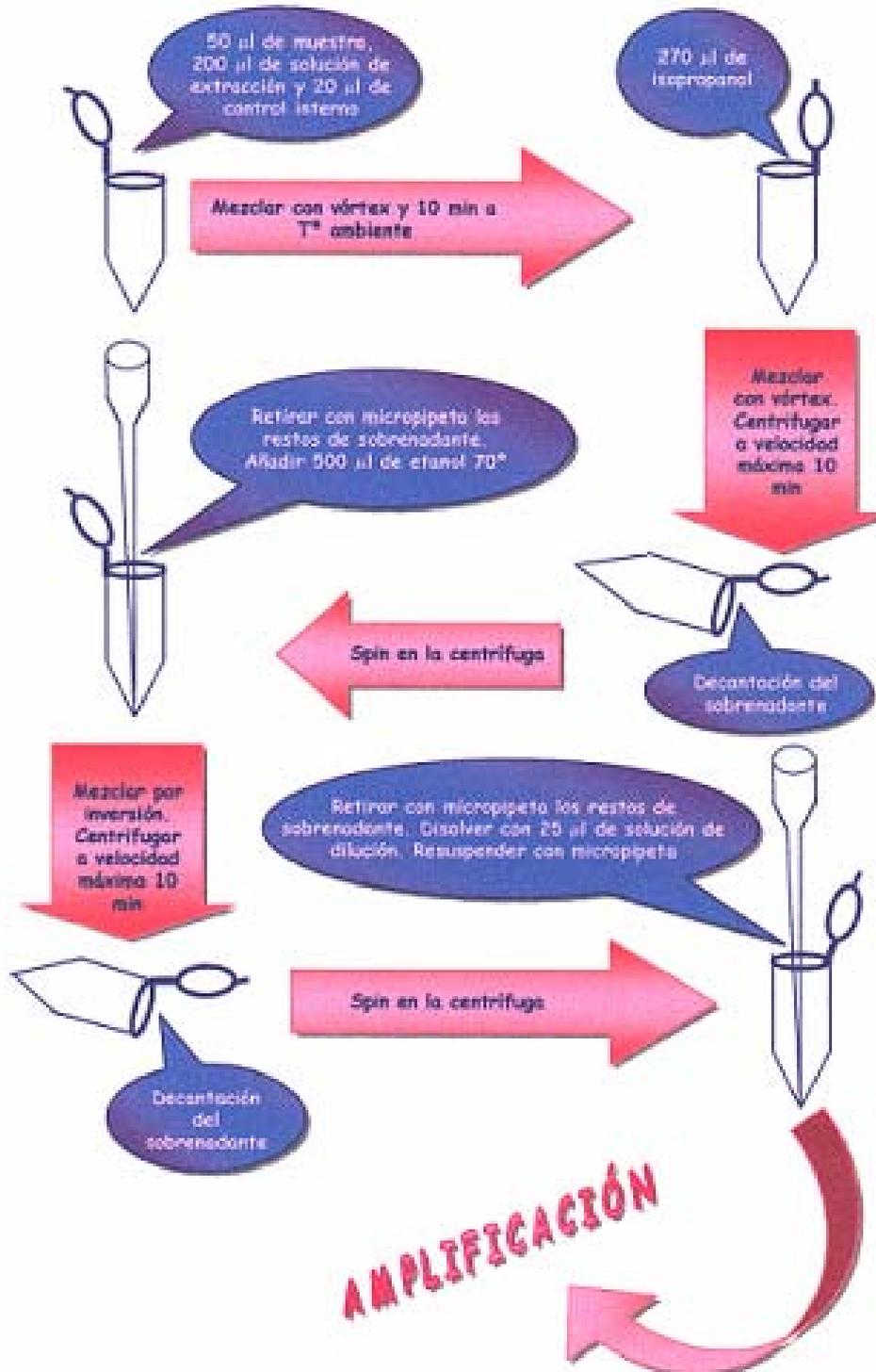
cols., 1993_a; Cone y cols., 1993_b; Kimberlin y cols., 1996; Lyall y col., 1995). Todos los extractos de ADN fueron amplificados por duplicado o triplicado.

Preparación de las muestras.- La sangre se tomó en tubos sin anticoagulante. Se centrifugó a 1500 g durante 20 minutos. Se separó el suero y se congeló en alícuotas de 50 µl a -70° C. El LCR se congeló en alícuotas de 50 µl a -70° C tras su obtención.

Extracción.- En un tubo estéril de microcentrífuga (1,5 ml) se añadieron 50 µl de muestra (suero o LCR), 200 µl de solución de extracción de muestras líquidas y 20 µl de control interno. Se mezcló con vórtex y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 270 µl de isopropanol, y se mezcló con vórtex. Se centrifugó a velocidad máxima en la microfuga (>12000 g) durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se le dio un spin en la microfuga, y se retiraron con micropipeta los restos de líquido sobrenadante. Se añadieron 500 µl de etanol de 70° y se mezcló por inversión repetida del tubo. Se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, se dio un spin en la microfuga y se retiraron con micropipeta los restos de sobrenadante. Se disolvió el precipitado obtenido con 25 µl de solución de dilución, y se resuspendió con la micropipeta. Se reservó una alícuota de 10 µl para la reacción de amplificación; el resto se guardó a -20° C (Figura 8).

Amplificación.- Se añadieron 5 µl de solución de ADN extraído a cada tubo de amplificación previamente descongelado conteniendo 45 µl de mezcla de reacción (50 mM de Tris-HCl pH 9,0, 20 mM de (NH₄)₂(SO₄), 2 mM de MgCl₂, 0,004% de Tween 20, 200 µM de cada dNTP, y 10 pmol de cada primer) y 30 µl de aceite de parafina. Los

Figura 8. Procedimiento de extracción del ADN previo a la realización de la PCR.



dNTP incluyen dUTP-digoxigenina que sustituye aleatoriamente a dTTP en la reacción de polimerización, quedando marcado con digoxigenina el producto amplificado.

Las secuencias de los primers empleados para la amplificación fueron las siguientes:

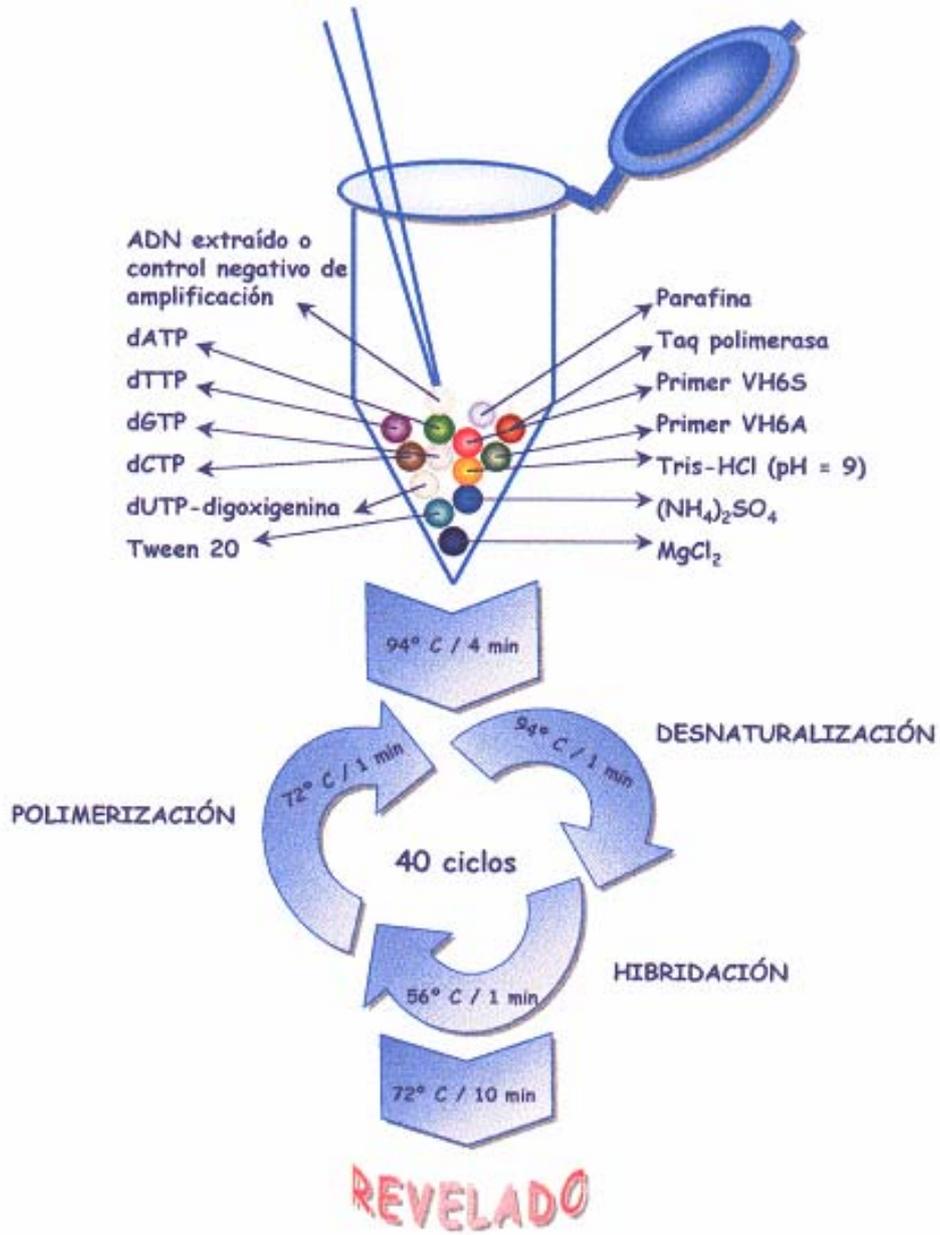
VH6S (sense): GAG GTA ATT TAT GGT GAT ACG GA

VH6A (antisense): TGT CTA CCA ATG TAT CTT TTT TT

Se añadieron 5 µl de control negativo a un tubo de amplificación que sirve como control negativo de la amplificación y de blanco de visualización. La Taq polimerasa se añadió a cada tubo justo antes de la amplificación, que se llevó a cabo en un termociclador que realizó un ciclo a 94° C durante 4 minutos; 40 ciclos de: desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación de primers a 56° C durante 1 minuto y polimerización a 72° C durante 1 minuto; un ciclo de 72° C durante 10 minutos (Figura 9).

Revelado.- Se llevó a cabo en placa de microtitulación, donde se procedió a la fijación de la sonda específica (oligo sonda) en los pocillos. Para ello, se prepararon las diluciones de la sonda específica de VHH-6 y de la sonda específica del control interno de amplificación, diluyendo 10 µl de la sonda específica en sendos 90 µl de solución de unión de sonda por cada muestra a analizar. La sonda específica de VHH-6 detecta una región conservada de la secuencia de ADN del gen de la polimerasa vírica. Se añadieron a cada pocillo de las columnas impares de la placa 100 µl de la solución de la sonda específica de VHH-6, incluyendo el del control positivo de detección, y en cada pocillo de las columnas pares, 100 µl de la solución de la sonda específica del control interno

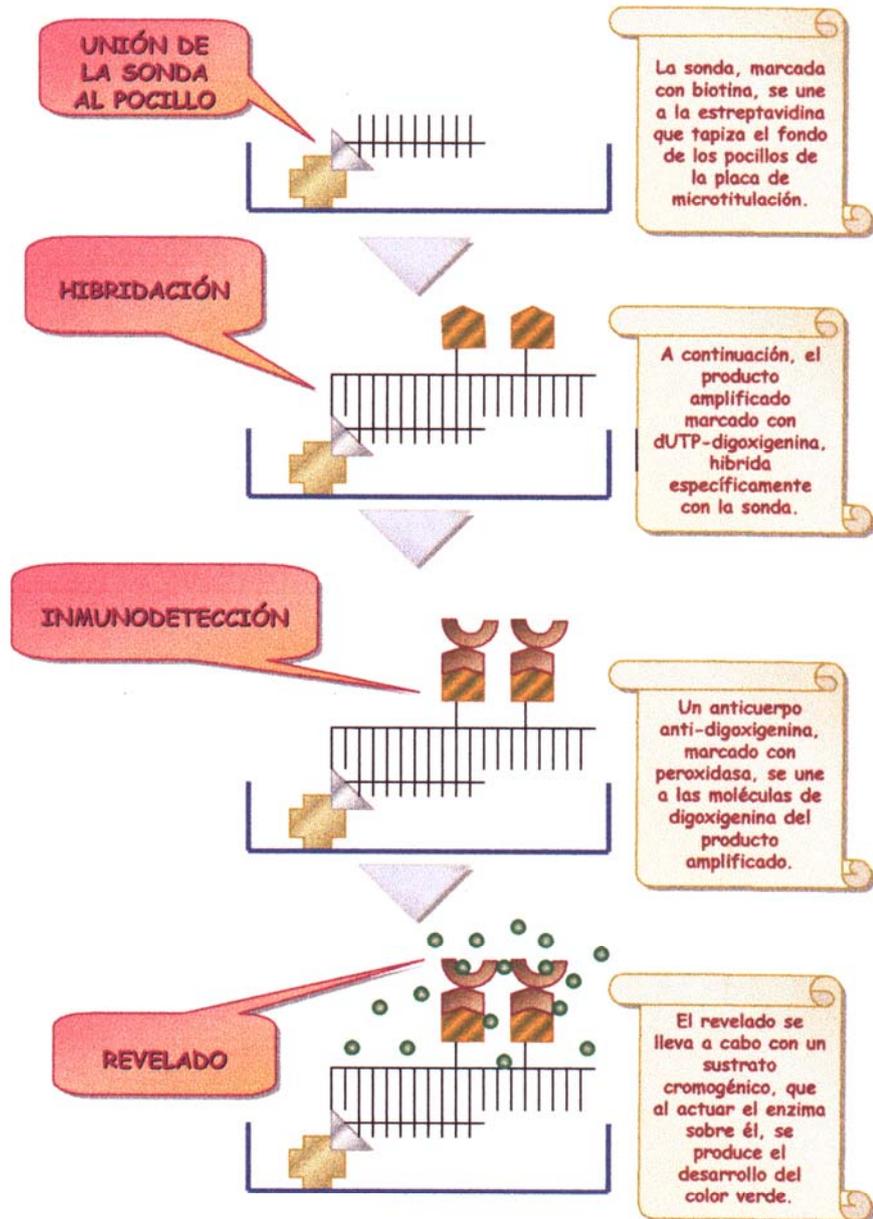
Figura 9. Procedimiento de amplificación del ADN.



de amplificación. Se incubaron los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces los pocillos con solución de lavado diluida en cuatro partes de agua destilada. A cada tubo de amplificado se le añadió 100 µl de diluyente y se mezcló bien. Se desnaturalizaron las muestras amplificadas a 100° C durante 10 minutos. Se enfriaron inmediatamente a 4° C durante 5 minutos. Se incubó la solución de hibridación a 37° C para resuspender el precipitado. Se añadieron 100 µl de solución de hibridación a cada pocillo y 10 µl de muestra desnaturalizada en un pocillo de la columna impar y otros 10 µl de la misma muestra en otro pocillo de la columna par pertenecientes ambos a la misma fila; esta operación se repitió para cada muestra desnaturalizada. Se incubó a 50° C durante 60 minutos en una estufa de hibridación. Se lavaron los pocillos como se ha indicado anteriormente. Se añadieron 100 µl de solución diluida (1:500) de conjugado (IgG anti-digoxigenina conjugada con peroxidasa) a cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se lavó como se indicó anteriormente. Se añadieron 100 µl de solución de revelado que contiene un sustrato cromogénico de la peroxidasa. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se midió en un lector de placas de microtitulación la absorbancia a 405 nm (A_{405}) (Figura 10).

Interpretación de los resultados.- Un resultado se consideró positivo cuando la A_{405} en el pocillo específico de la muestra fue mayor a 0,35 y la A_{405} en el pocillo del control interno de amplificación paralelo fue mayor a 0,5. Las A_{405} entre 0,35 – 0,45 se consideran zona gris y se recomienda repetir el ensayo. Cuando el título del virus es muy alto, el producto amplificado de éste competirá con el del control interno, por lo

Figura 10. Proceso de revelado del ADN en placa de microtitulación.



que la A_{405} en el pocillo específico de la muestra será mayor a 0,5 y la A_{405} en el pocillo del control interno de amplificación paralelo será menor a 0,5. El resultado fue negativo cuando el pocillo específico de la muestra presentó una A_{405} inferior a 0,35 y la A_{405} del pocillo del control interno de amplificación paralelo fue mayor a 0,5. La reacción de amplificación se consideró inhibida cuando la A_{405} del pocillo específico fue menor a 0,35 y la A_{405} del control interno menor de 0,5. La reacción de amplificación se consideró no válida cuando la A_{405} del pocillo control negativo de amplificación fue mayor de 0,25 (Figura 11). La sensibilidad del método, según el fabricante, fue de 100 copias.

2. Investigación de anticuerpos anti-VHH-6, anti-CMV y anti-VEB

El estudio de la IgG y la IgM específicas frente a VHH-6 se realizó mediante un ELISA indirecto comercial (Human Virus herpes-6 ELISA Test, PanBio, Australia) así como la IgG e IgA frente a CMV y VEB (Enzygnost®, Dade Behring, Alemania). La IgA frente a VHH-6 se investigó mediante un ELISA elaborado en nuestro laboratorio con reactivos PanBio y Dade Behring. En la figura 12 se representa el protocolo general para la realización de los diferentes ensayos para la detección de los anticuerpos.

Las pruebas se realizaron de manera automatizada mediante un diluidor de muestras (Tecan, Megaflex, Suiza) y un procesador de placas de ELISA (Behring ELISA Processor III, BEP III). La exactitud y reproducibilidad de los resultados se comprobó previamente, aceptándose variaciones en la absorbancia de las muestras no superiores al 5%, mediante la repetición del procesamiento del 25% de las muestras.

Figura 11. Interpretación de los resultados de la PCR.

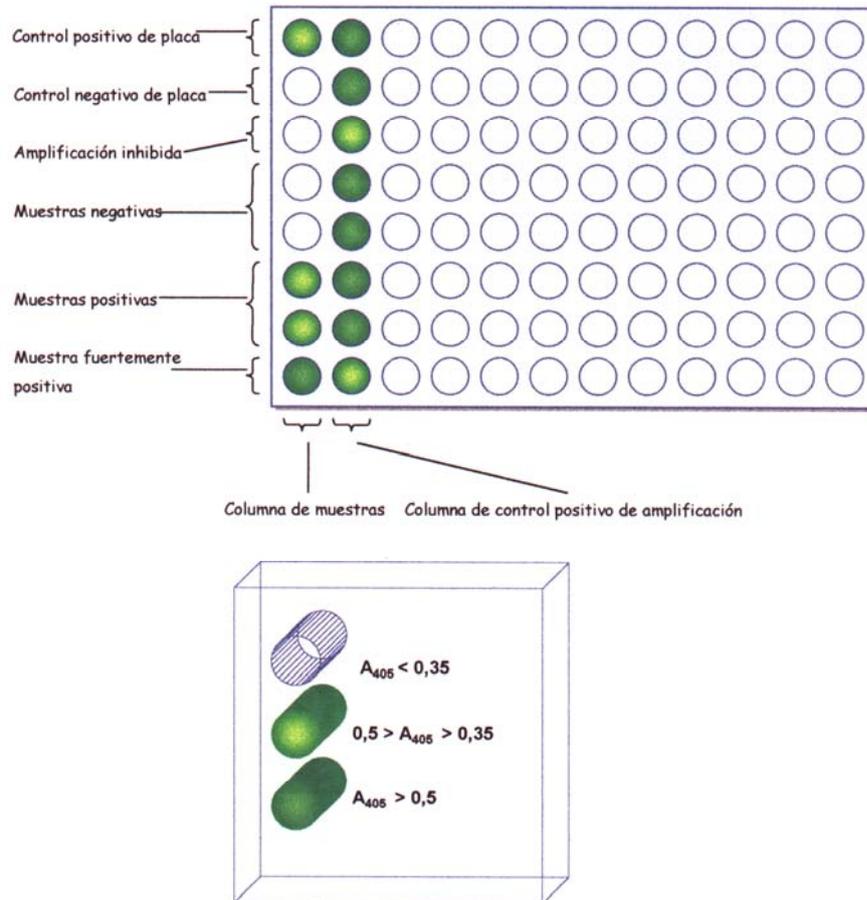
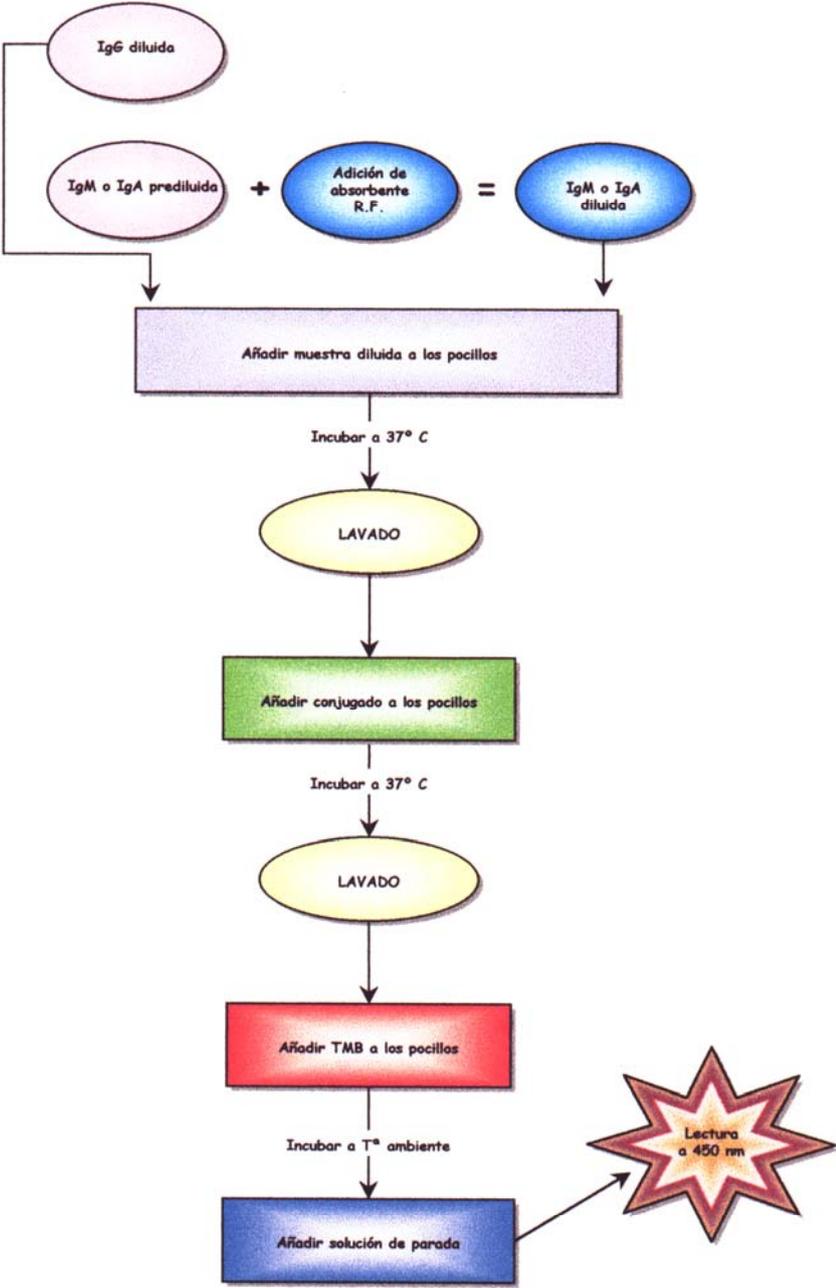


Figura 12. Procedimiento general de los tests de ELISA para la detección de IgG, IgA e IgM frente a VHH-6, CMV y VEB.



2.1. IgG específica anti-VHH-6

Para ello se prepararon diluciones de las muestras y los controles al 1:100 con diluyente de muestra (tampón salino Tris). Se mezclaron por pipeteo. Se dispensaron 100 µl de controles (control positivo, positivo límite por duplicado y control negativo) y muestras diluidas en sus respectivos pocillos (poliestireno recubierto con antígeno purificado de VHH-6). Se incubó a 37° C durante 20 minutos. Se lavó 6 veces con tampón de lavado diluido en 19 partes de agua destilada. Se dispensaron 100 µl de conjugado anti-IgG humana de origen ovino marcada con peroxidasa de rábano. Se incubó la placa a 37° C durante 20 minutos. Se lavó como se indicó anteriormente. Se dispensaron 100 µl de cromógeno / sustrato (mezcla de tetrametilbencidina en peróxido de hidrógeno) en cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se pipetearon 100 µl de solución de parada (ácido fosfórico 1M) en cada pocillo. Se leyó la absorbancia antes de 30 minutos a 450 nm / 600-650 nm (A_{450}). El cálculo e interpretación de los resultados se hizo de forma semicuantitativa y se calcularon las unidades arbitrarias para cada muestra como sigue:

$$\text{Unidades Arbitrarias (UA)} = 10 \times \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia media de positivos límite}}$$

Las muestras se consideraron negativas cuando el resultado obtenido estuvo por debajo de 10 UA, y positivas, cuando superaron las 10 UA. Cifras comprendidas entre 9 y 11 UA se consideraron dudosas. Este test fue validado sobre muestras estudiadas

previamente en nuestro laboratorio (datos no aportados, Roldán y cols., 1993; Roldán y cols., 1995; Roldán y cols., 1996).

2.2. IgM e IgA específicas anti-VHH-6

Se llevó a cabo mediante el sistema comercial Human Virus herpes-6 ELISA Test (PanBio). Se hicieron prediluciones de las muestras 1:10 en diluyente de suero (tampón salino Tris). Se mezclaron bien por pipeteo. Se diluyeron las muestras prediluidas 1:10 en absorbente de muestras (preparación de anticuerpos caprinos precipitantes de la IgG humana, en tampón salino Tris) al 1:100. Los controles positivo, negativo y positivo límite se proveen ya diluidos. La técnica fue exactamente igual a la de la IgG anti-VHH-6. Para la IgM, los reactivos fueron comunes exceptuando el conjugado, que fue una anti-IgM-humana de origen ovino conjugada con peroxidasa de rábano. Se consideraron muestras positivas aquellas cuyas A_{450} eran mayores a la A_{450} media de los positivos límite. El cálculo e interpretación de los resultados también se hizo de forma semicuantitativa, con la diferencia de la consideración de resultados positivos (> 20 UA) o negativos (≤ 20 UA). Para el caso de la IgA anti-VHH-6, las muestras fueron diluidas a 1:40 con una mezcla 1/1 de tampón PBS y una solución de anticuerpos anti-IgG (RF-Absorbent®, Dade Behring). El conjugado (anti-IgA humana de conejo marcada con peroxidasa, Dade Behring) se mantuvo durante 60 minutos a 37° C; el cromógeno (mezcla 1/1 de dihidrocloruro de tetrametilenbencidina (5 g / l), Enzygnost® / TMB, (Dade Behring) con peróxido de hidrógeno 0,1 g / l) se aplicó 30 minutos a 20° C, y la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 N), durante 10 minutos. Las muestras fueron consideradas positivas cuando la A_{450} del pocillo correspondiente fue mayor a la A_{450} media de los positivos límite. Estas pruebas fueron validadas sobre

muestras estudiadas previamente por nosotros (datos no aportados, Gutiérrez y cols., 1997_b).

2.3. IgG específica anti-CMV

Se llevó a cabo mediante el kit comercial Enzygnost® Anti-CMV / IgG (Dade Behring). Los reactivos y muestras se aclimataron media hora a temperatura ambiente. Las tiras de los pocillos fueron dobles; la fila izquierda estaba recubierta con antígeno (Ag) constituido por fibroblastos humanos infectados con CMV (cepa Ma23), y la fila derecha, con antígeno control (AgCo) formado por estas células no infectadas. En cada placa se reservaron el primer y último par de pocillos para las determinaciones de referencia P / N (IgG humana específica frente a CMV). En cada pocillo se dispensaron 200 µl de tampón POD para muestras (tampón Tris 0,3M). En cada par de pocillos Ag / AgCo se dispensaron 20 µl de referencia (P / N) o de muestra prediluida en tampón POD, según correspondió. Se mezcló por pipeteo. Se incubó a 37° C durante una hora. Se lavó 4 veces con solución de lavado POD diluida 1:20 en agua destilada. Se dispensaron en cada pocillo 100 µl de solución de conjugado (IgG de conejo anti-IgG humana conjugada con peroxidasa en tampón Tris 0,05 M) diluida al 1:50 (en tampón microbiológico para conjugado; EDTA en tampón fosfato 0,01 M, gentamicina, clorometilisotiazolona, metilisotiazolona). Se incubó en las mismas condiciones. Se lavó como se describió más arriba. Se dispensaron 100 µl de solución de cromógeno (1 parte peróxido de hidrógeno en 10 partes de tampón / sustrato TMB). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, en oscuridad. Se añadieron 100 µl de solución de parada. El cálculo y la interpretación de los resultados se hizo de forma

cuantitativa. Para cada muestra o referencia se determinó la diferencia de A_{450} (ΔE) entre pocillos: $\Delta E = (E_{Ag} - E_{AgCo})$. Cada referencia P / N debe tener ΔE dentro de un rango de valores límites especificados para cada equipo. Se calculó un factor de corrección que es la razón del valor nominal dado para cada número de lote y la ΔE de la referencia P / N. Todos los valores de ΔE se multiplicaron por el factor de corrección, obteniendo valores corregidos.

Los valores de ΔE corregidos resultantes se emplearon para el cálculo del título de anticuerpos de cada muestra con la siguiente fórmula: $\log_{10} \text{Título} = \alpha \times \Delta E^\beta$. α y β se obtuvieron de la tabla de valores específicos del lote de reactivo.

Los valores de ΔE corregidos inferiores a 0,2 no se emplearon en el cálculo del título. Las muestras con ΔE corregir superiores a 2,5, se diluyeron al 1/10 y se repitieron; el valor obtenido se corrigió por este método.

Los resultados inferiores a un título de 230 fueron negativos. A partir de este título, la prueba se interpretó como positiva (Gutiérrez y cols., 1994; Gutiérrez y cols., 1997_a; Gutiérrez y cols., 1997_b; Gutiérrez y cols., 1998_b; Gutiérrez y cols., 1998_c).

2.4. IgG específica anti-VEB

Se realizó con la prueba comercial Enzygnost® Anti EBV / IgG (Dade Behring) que en esencia es igual a la anterior pero difiere en el antígeno; la fila de la izquierda contiene el antígeno (Ag) constituido por células linfoblastoides infectadas con VEB (cepa B95-9). El antígeno control (AgCo) de la fila derecha se obtuvo a partir de la misma línea celular sin infectar. La solución de referencia P / N contenía IgG humana específica frente a VEB en solución tampón Tris (20 mM). El cálculo de los valores de

ΔE , el factor de corrección y los valores de ΔE corregidos se hizo igual que en el caso de CMV y también dependió del número de lote utilizado. La fórmula empleada en el método- α calcula la cantidad de anticuerpos de cada muestra para sus respectivos valores de absorbancia corregidos: $\log_{10} \text{UI / ml} = \alpha \times \Delta E^\beta$, siendo α y β característicos del lote.

Los valores inferiores a 25 UI / ml son considerados como negativos. Los valores superiores se consideraron positivos (Gutiérrez y cols., 1992; Gutiérrez y cols., 1994; Gutiérrez y cols., 1997_b).

2.5. IgA anti-CMV y anti-VEB

Se llevó a cabo mediante un ELISA indirecto. Esta prueba fue validada por nuestro laboratorio, usando sueros previamente estudiados (datos no aportados, Gutiérrez y cols., 1992; Gutiérrez y cols., 1997_b; Gutiérrez y cols., 1998_c; Gutiérrez y cols., 1999) Las muestras fueron diluidas a 1:40 con una mezcla 1/1 de tampón PBS y una solución de anticuerpos anti-IgG (RF-Absorbent®, Dade Behring). Se empleó la misma base antigénica que en el ensayo de las respectivas IgG anti-CMV y anti-VEB. Se dispensaron 200 μl de suero diluido en cada pocillo. Se incubaron una hora a 37° C. Se lavó a continuación 5 veces con PBS. Se dispensaron a continuación 200 μl de un conjugado anti-IgA humano (antihuman IgA-POD®, Dade Behring) que se preparó diluyéndolo al 1:50 con tampón PBS. Se incubó una hora a 37° C y se lavó a continuación cinco veces con PBS. Se dispensó a continuación una mezcla 1/1 de dihidrocloruro de tetrametilenbencidina (5 g / l) (Enzygnost® / TMB, Dade Behring) con peróxido de hidrógeno (0,1 g / l), y se incubó 30 min. a 20° C. La reacción se

detuvo con la adición de 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 N). Se midió la A_{450} . Los resultados fueron considerados positivos cuando las A_{450} estaban por encima de 0,6, tanto para CMV como para VEB.

3. Método estadístico

Las variables cuantitativas se resumieron en media y desviación estándar. Para analizar la relación entre este tipo de variables se utilizó el test de Student (diferencia en los títulos de anticuerpos entre los diferentes grupos). El test de la χ^2 de Pearson se empleó para asociar porcentajes de positividad con variables cualitativas. Para analizar la correlación entre los títulos de anticuerpos y el orden secuencial de las muestras del seguimiento se utilizó el test de rangos con signo de Wilcoxon.

RESULTADOS

I. RESULTADOS GENERALES

En la tabla 8 se reflejan los resultados de obtenidos en la PCR, en los ELISA de IgG, IgM e IgA anti-VHH-6, IgG e IgA anti-CMV y anti-VEB en los sueros y los LCR procedentes de los enfermos con EM (Grupo I, muestras 1 a 41) y de los controles con OEN (Grupo II, muestras 42 a 72).

Los resultados positivos obtenidos para cada prueba realizada a los grupos I, II y III se reflejan en la tabla 9.

1. Resultados en función de la forma clínica de la EM

En las figuras 13 a 15 se representan los resultados de las IgG anti-VHH-6, anti-CMV y anti-VEB en los sueros de los enfermos con EM del grupo I, según la forma clínica de la misma. Se observa que los resultados no son comparables debido a que el número de muestras en cada grupo es muy dispar.

2. Resultados en función del sexo de los pacientes con EM

En la figura 16 se representan los resultados de los ELISA obtenidos para los anticuerpos en suero en función del sexo de los enfermos con EM del grupo I.

En las mujeres se observa que es más abundante la IgG, la IgM y la IgA anti-VHH-6 que en los hombres, así como la IgA anti-CMV y la IgG y la IgA anti-VEB; en cambio, la IgG anti-CMV es más abundante en hombres que en mujeres. Lo más destacable es la diferente seroprevalencia para la IgG frente a VHH-6 (en las mujeres, 72,7 %; en los hombres, 29,4%), pero sin significación estadística ($p > 0,05$; T de Student).

Tabla 8. Resultados obtenidos para la PCR de VHH-6, IgG, IgM e IgA anti-VHH-6, CMV y VEB en el suero y el LCR de los enfermos con EM (Grupo I: muestras 1 a 41) y de los enfermos con OEN (Grupo II: muestras 42 a 72).

N°	Iniciales	Sexo	Edad	Clínica	Evolución (años)	Escala de incapacidad	PCR suero	PCR LCR	IgG VHH6 suero	IgM VHH6 suero	IgA VHH6 suero	IgG VHH6 LCR	IgM VHH6 LCR	IgA VHH6 LCR	IgG CMV suero	IgA CMV suero	IgG CMV LCR	IgA CMV LCR	IgG VEB suero	IgA VEB suero	IgG VEB LCR	IgA VEB LCR
1	SCA	F	19	EMRR	10	1,50	NEG	NEG	11,30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	24000	NEG	NEG	NEG	350	NEG	NEG	NEG
2	ARB	M	44	EMRR	3	3,00	NEG	NEG	14,20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8700	NEG	NEG	NEG	810	NEG	NEG	NEG
3	VOR	F	17	EMRR	4	3,00	NEG	NEG	24,60	NEG	9,36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	380	NEG	NEG	NEG
4	RSF	F	35	EMRR	2	1,00	NEG	NEG	18,70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3300	NEG	NEG	NEG	290	NEG	NEG	NEG
5	JEPS	M	58	EMPP	26	8,00	NEG	NEG	NEG	NEG	*MIN	NEG	NEG	NEG	1600	NEG	NEG	NEG	140	NEG	NEG	NEG
6	PS	M	40	EMRR	2	2,50	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	13900	NEG	MIN	MIN	310	NEG	MIN	MIN
7	JMTS	M	58	EMPS	37	6,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	142000	3,40	NEG	NEG	260	NEG	NEG	NEG
8	ECC	M	51	EMPS	4	3,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1700	NEG	NEG	NEG	45	NEG	NEG	NEG
9	DMB	F	65	EMPP	11	6,00	NEG	NEG	10,70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	17500	NEG	NEG	NEG	270	NEG	NEG	NEG
10	MCPR	F	35	EMRR	8	3,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	4900	NEG	NEG	NEG	110	NEG	NEG	NEG
11	FRB	M	46	EMPS	9	3,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	9900	1,10	NEG	NEG	320	NEG	NEG	NEG
12	SVF	M	31	EMRR	9	4,00	NEG	NEG	24,50	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	8900	MIN	NEG	NEG	200	MIN	NEG	NEG
13	FJRV	M	26	EMRR	2	3,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	310	NEG	NEG	NEG
14	BMM	M	49	EMRR	4	3,50	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	410	MIN	NEG	NEG	180	MIN	NEG	NEG
15	MJSC	F	49	EMRR	0	2,50	NEG	NEG	22,60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	5100	NEG	NEG	NEG	370	NEG	NEG	NEG
16	ASC	M	52	EMPS	4	2,00	NEG	NEG	MIN	MIN	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
17	AJC	M	44	EMRR	10	1,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8100	NEG	NEG	NEG	260	NEG	NEG	NEG
18	MCBRP	F	46	EMRR	12	1,50	NEG	NEG	NEG	19,10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	37	NEG	NEG	NEG
19	RJL	F	26	EMRR	9	2,50	NEG	NEG	12,80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	19000	2,80	NEG	NEG	110	NEG	NEG	NEG
20	ZS	F	29	EMRR	3	4,00	NEG	NEG	12,30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3800	NEG	NEG	NEG	260	NEG	NEG	NEG
21	JMAT	M	21	EMRR	3	2,50	NEG	NEG	13,30	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
22	LGR	M	67	EMPP	11	6,00	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	11000	MIN	NEG	NEG	140	MIN	NEG	NEG
23	MDCP	F	55	EMPP	13	6,00	NEG	NEG	MIN	MIN	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
24	SGM	M	28	EMRR	24	2,00	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
25	MAPF	F	35	EMRR	5	3,50	NEG	NEG	11,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	19000	3,30	NEG	NEG	83	1,30	NEG	NEG

Tabla 8. Continuación.

Nº	Iniciales	Sexo	Edad	Clínica	Evolución (años)	Escala de incapacidad	PCR suero	PCR LCR	IgG VHH6 suero	IgM VHH6 suero	IgA VHH6 suero	IgG VHH6 LCR	IgM VHH6 LCR	IgA VHH6 LCR	IgG CMV suero	IgA CMV suero	IgG CMV LCR	IgA CMV LCR	IgG VEB suero	IgA VEB suero	IgG VEB LCR	IgA VEB LCR
26	MS	M	54	EMRR	4	7,00	NEG	NEG	13,00	NEG	3,59	NEG	NEG	NEG	21000	NEG	NEG	NEG	520	NEG	NEG	NEG
27	MDNM	F	49	EMRR	23	3,50	NEG	NEG	35,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	4000	NEG	NEG	NEG	64	NEG	NEG	NEG
28	VMA	F	49	EMRR	24	3,50	NEG	NEG	10,40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	10000	2,10	NEG	NEG	610	1,70	NEG	NEG
29	MDER	F	38	EMRR	17	3,50	NEG	NEG	32,40	NEG	NEG	11,70	NEG	NEG	20000	NEG	NEG	NEG	460	1,20	NEG	NEG
30	PLB	F	44	EMRR	3	4,00	NEG	NEG	19,20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	25000	1,80	NEG	NEG	180	NEG	NEG	NEG
31	MCRG	F	36	EMRR	6	4,50	NEG	NEG	24,80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	150	NEG	NEG	NEG
32	PAC	M	23	EMRR	4	3,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	5400	1,00	NEG	NEG	120	NEG	NEG	NEG
33	AFG	F	38	EMPS	3	3,00	NEG	NEG	NEG	NEG	5,03	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	860	1,50	NEG	NEG
34	JMB	M	37	EMRR	4	1,50	NEG	NEG	10,70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	46	NEG	NEG	NEG
35	DCI	F	28	EMRR	6	2,00	NEG	NEG	NEG	19,20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	120	NEG	NEG	NEG
36	MJCC	F	28	EMRR	7	5,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8900	NEG	NEG	NEG	160	NEG	NEG	NEG
37	IRC	F	26	EMRR	4	1,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	9700	NEG	NEG	NEG	530	1,50	NEG	NEG
38	CPG	F	37	EMRR	4	2,00	NEG	NEG	14,10	NEG	3,34	NEG	NEG	NEG	16000	1,40	NEG	NEG	200	NEG	NEG	NEG
39	APD	M	39	EMRR	18	4,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	2000	NEG	NEG	NEG	450	NEG	NEG	NEG
40	ROP	F	30	EMRR	4	4,00	NEG	NEG	25,60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	16000	1,50	NEG	NEG	200	NEG	NEG	NEG
41	MCAR	F	24	EMRR	8	2,00	NEG	NEG	20,50	NEG	4,45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	100	NEG	NEG	NEG
42	BAS	M	60	OEN	-	-	NEG	NEG	12,10	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	5700	NEG	NEG	NEG	430	NEG	NEG	NEG
43	FCP	F	32	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	20700	NEG	NEG	NEG	97	NEG	NEG	NEG
44	CEM	F	42	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	570	NEG	NEG	NEG
45	AMNO	F	58	ACV	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3200	NEG	NEG	NEG	53	NEG	NEG	NEG
46	RFA	F	28	HICB	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	220	NEG	NEG	NEG
47	MPS	M	63	ELA	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	6000	NEG	NEG	NEG	58	NEG	NEG	NEG
48	JAMR	M	45	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1600	NEG	NEG	NEG	190	NEG	NEG	NEG
49	MRG	M	68	ELA	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	6900	NEG	NEG	NEG	210	NEG	NEG	NEG
50	APM	F	61	ELA	-	-	NEG	NEG	11,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
51	MDCA	F	36	HICB	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	3200	NEG	NEG	NEG	91	1,00	NEG	NEG
52	JSG	M	38	PRN	-	-	NEG	NEG	21,10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	9500	NEG	NEG	NEG	5000	NEG	NEG	NEG

Tabla 8. Continuación.

Nº	Iniciales	Sexo	Edad	Clínica	Evolución (años)	Escala de incapacidad	PCR suero	PCR LCR	IgG VHH6 suero	IgM VHH6 suero	IgA VHH6 suero	IgG VHH6 LCR	IgM VHH6 LCR	IgA VHH6 LCR	IgG CMV suero	IgA CMV suero	IgG CMV LCR	IgA CMV LCR	IgG VEB suero	IgA VEB suero	IgG VEB LCR	IgA VEB LCR
53	AGS	F	29	PRN	-	-	NEG	NEG	12,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	220	NEG	NEG	NEG
54	VMSG	M	29	PRN	-	-	NEG	NEG	18,70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8000	1,60	NEG	NEG	570	1,50	NEG	NEG
55	MPOP	F	39	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	420	NEG	NEG	NEG	170	NEG	NEG	NEG
56	BLG	M	70	ACV	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	13000	1,80	NEG	NEG	100	NEG	NEG	NEG
57	MGM	M	49	ACV	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	24000	NEG	NEG	NEG	320	NEG	NEG	NEG
58	JMPA	M	62	ACV	-	-	NEG	NEG	13,00	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	23000	1,50	NEG	NEG	120	NEG	NEG	NEG
59	MJM	F	67	ACV	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	5300	2,00	NEG	NEG	55	NEG	NEG	NEG
60	NS	F	36	ACV	-	-	NEG	NEG	11,10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8700	NEG	NEG	NEG	140	NEG	NEG	NEG
61	ABA	F	53	OEN	-	-	NEG	NEG	10,70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	33000	NEG	660	NEG	860	NEG	NEG	NEG
62	JMBE	M	49	OEN	-	-	NEG	NEG	14,80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	19000	NEG	NEG	NEG	91	NEG	NEG	NEG
63	MCOM	F	29	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	7800	NEG	NEG	NEG	160	NEG	NEG	NEG
64	TCB	F	81	HICB	-	-	NEG	NEG	17,60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	19000	NEG	NEG	NEG	86	NEG	NEG	NEG
65	MGC	M	52	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
66	MNMG	F	34	HICB	-	-	NEG	NEG	MIN	MIN	MIN	NEG	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG	MIN	MIN	NEG	NEG
67	MJTB	F	44	HICB	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	2000	NEG	NEG	NEG	71	1,20	NEG	NEG
68	AGP	M	57	ACV	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	730	NEG	NEG	NEG	91	1,30	NEG	NEG
69	BLS	F	20	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	8100	1,40	NEG	NEG	110	NEG	NEG	NEG
70	IRL	F	80	OEN	-	-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	5800	1,50	NEG	NEG	100	NEG	NEG	NEG
71	RCC	F	53	HICB	-	-	NEG	NEG	11,20	21,10	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	NEG	MIN	NEG	MIN	NEG	MIN	NEG
72	JAJR	M	31	OEN	-	-	NEG	NEG	11,50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	MIN	2,30	MIN	NEG	MIN	NEG	MIN	NEG

*MIN = muestra insuficiente.

Tabla 9. Porcentaje de positivos para las pruebas realizadas en las muestras de cada uno de los grupos de estudio.

		VHH-6 (%)				CMV (%)		VEB (%)	
		IgG	IgM	IgA	PCR	IgG	IgA	IgG	IgA
GRUPO I	<i>Sueros</i>	53,8	0	15,6	0	78,4	26,5	91,9	14,7
	<i>LCR</i>	2,4	0	0	0	0	0	0	0
GRUPO II	<i>Sueros</i>	40	3,3	0	0	85,2	24,1	96,3	13,8
	<i>LCR</i>	0	0	0	0	3,4	0	0	0
GRUPO III (Seguimiento serológico)	<i>Total</i>	100	28,4	49,3					

Figura 13. Porcentaje de seropositividad de IgG anti-VHH-6 en los enfermos según la forma clínica de EM.

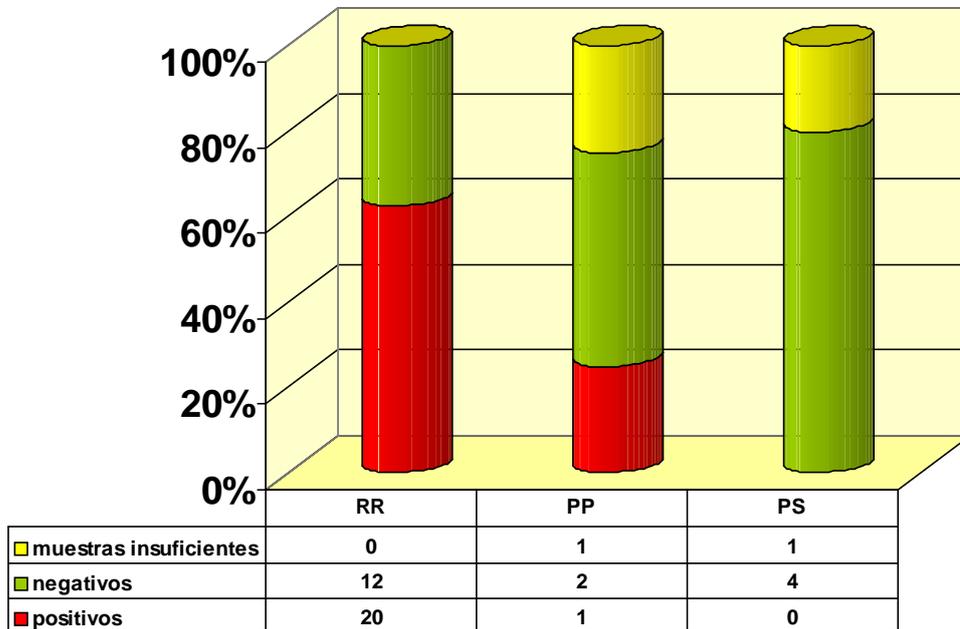


Figura 14. Porcentaje de seropositividad de IgG anti-CMV en los enfermos según la forma clínica de EM.

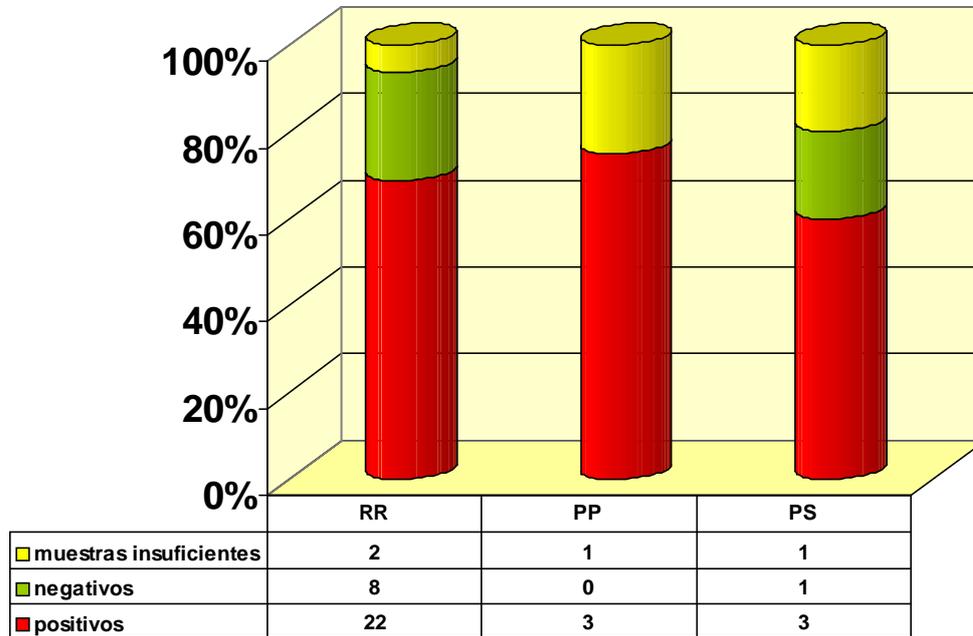


Figura 15. Porcentaje de seropositividad de IgG anti-VEB en los enfermos según la forma clínica de EM.

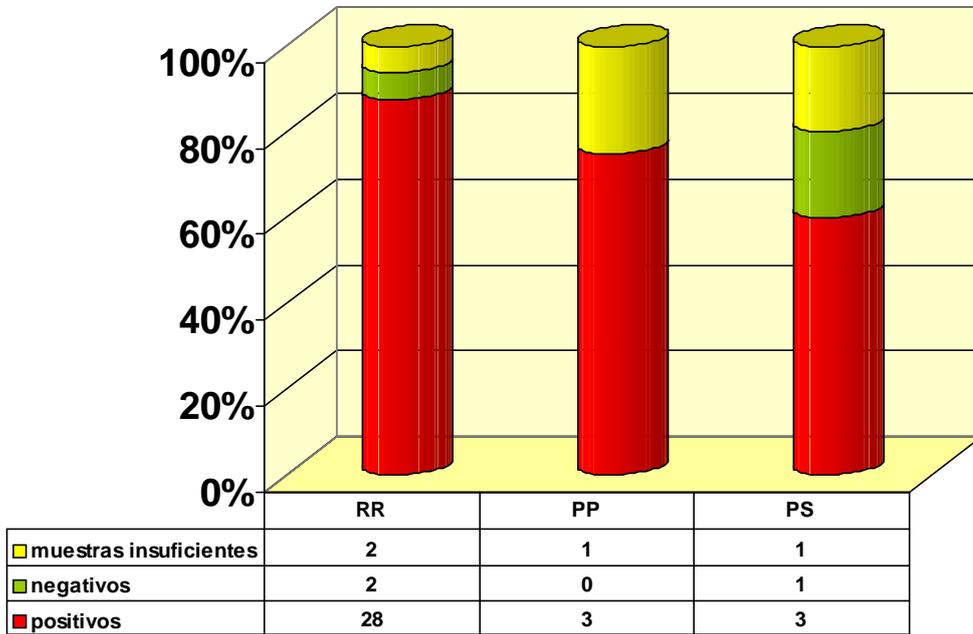
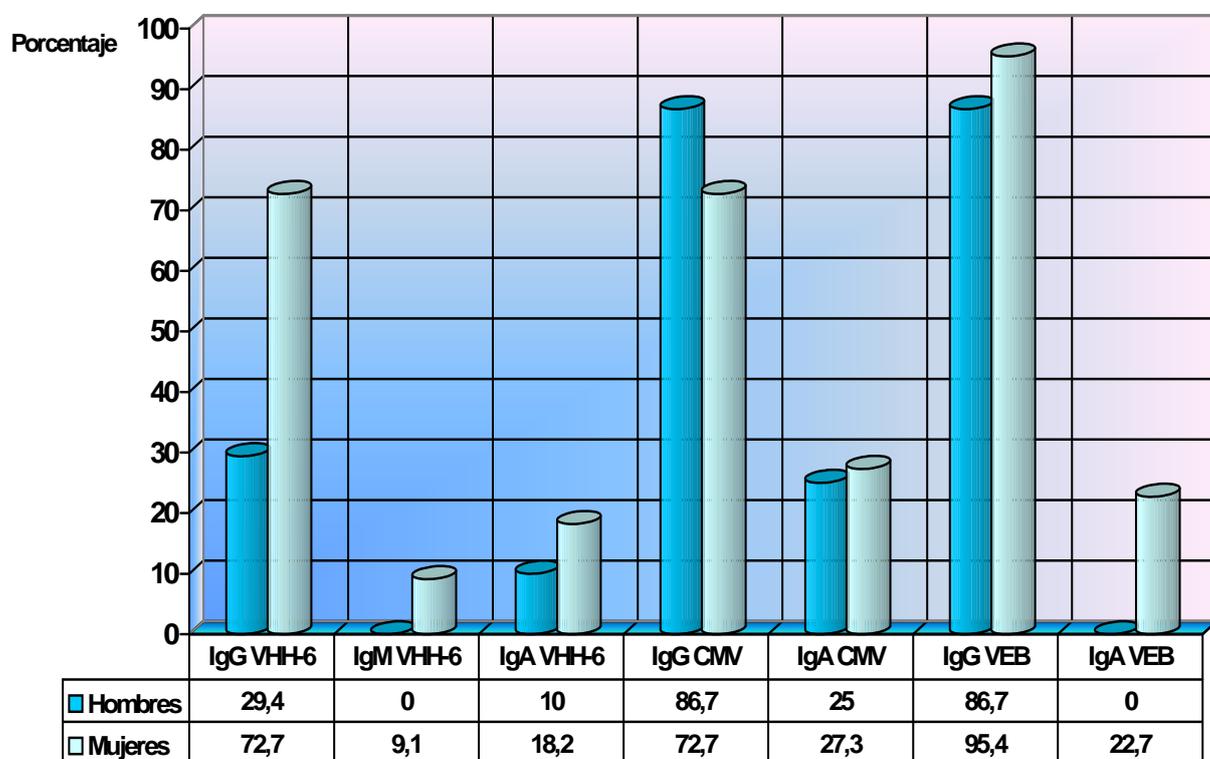


Figura 16. Porcentaje de seropositividad en función del sexo de los enfermos con EM.



3. Resultados en función de la edad de los pacientes con EM.

En la figura 17 se representa el porcentaje de ELISA positivos en suero para los enfermos con EM del grupo I en función de la edad de los mismos.

4. Resultados del seguimiento serológico de los pacientes con EM del grupo III

En la tabla 10 y figuras 18 a 20 se relacionan los resultados obtenidos en la investigación de los anticuerpos anti-VHH-6 en los 27 enfermos del seguimiento (Grupo III).

Figura 17. Porcentaje de seropositividad en enfermos con EM en función de la edad.

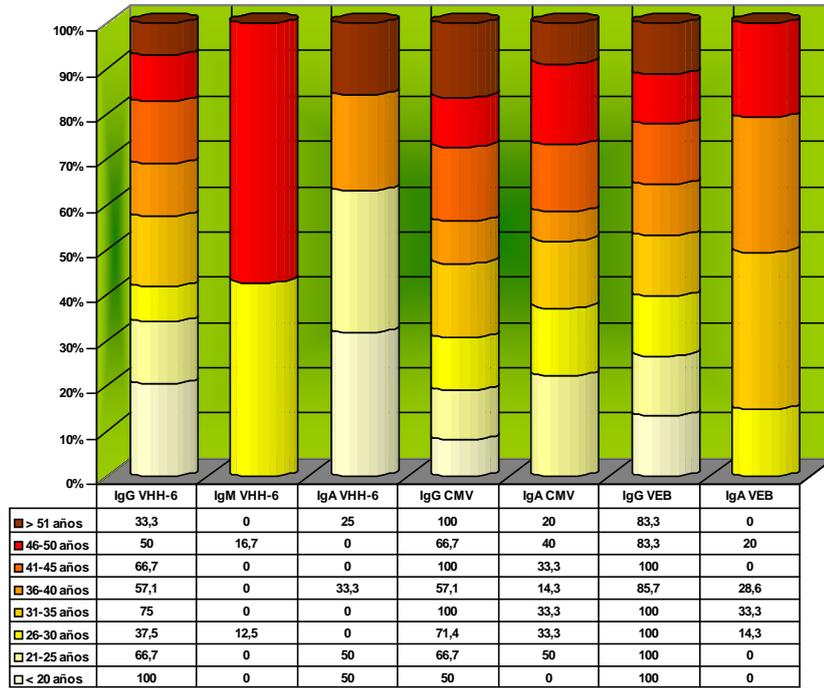


Tabla 10. Resultados del seguimiento de anticuerpos anti-VHH-6 en enfermos con EM.

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	FECHA DE EXTRACCIÓN	IgG	IgM	IgA
3-339	1	2	MAAC	4-Nov-98	32,5	NEG	6,76
3-457				4-Feb-99	31,5	NEG	NEG
3-327	2	3	MCAR	30-Oct-98	24,3	NEG	NEG
3-429				20-Ene-99	31,2	NEG	NEG
3-554				16-Abr-99	36,2	NEG	2,07
3-343	3	2	MABM	4-Nov-98	34,0	NEG	1,11
3-493				2-Mar-99	29,3	NEG	2,00
3-413	4	2	JBP	26-Nov-98	26,4	25,1	3,98
3-525				10-Mar-99	31,1	NEG	1,6
3-331	5	2	SCT	3-Nov-98	21,8	NEG	2,1
3-582				23-Abr-99	31,3	NEG	NEG
3-373	6	3	DCI	11-Nov-98	17,1	28,8	NEG
3-437				28-Ene-99	19,6	20,1	5,41
3-602				29-Abr-99	14,1	NEG	NEG
3-323	7	3	MJCC	20-Oct-98	23,1	NEG	NEG
3-433				22-Ene-99	22,2	NEG	NEG
3-549				15-Abr-99	20,8	NEG	3,9
3-354	8	3	JGZ	4-Nov-98	18,1	NEG	2,89
3-485				11-Feb-99	12,2	NEG	NEG
3-586				23-Abr-99	10,6	NEG	2,84
3-381	9	3	AHH	11-Nov-98	41,9	30,4	1,06
3-473				9-Feb-99	49,9	NEG	NEG
3-578				22-Abr-99	25,5	NEG	NEG
3-318	10	2	MJLG	22-Oct-98	20,7	NEG	1,8
3-425				20-Ene-99	19,8	NEG	NEG
3-393	11	2	JML	13-Nov-98	11,7	NEG	NEG
3-521				9-Mar-99	12,3	NEG	4,57

Tabla 10. Continuación.

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	FECHA DE EXTRACCIÓN	IgG	IgM	IgA
3-389	12	2	RMP	12-Nov-98	43,3	44,9	NEG
3-497				4-Mar-99	33,7	27,1	1,33
3-409	13	2	JMB	24-Nov-98	28,4	NEG	1,01
3-517				9-Mar-99	30,3	NEG	NEG
3-365	14	4	MJMM	6-Nov-98	58,5	31,0	NEG
3-421				16-Dic-98	24,9	37,2	NEG
3-533				16-Mar-99	55,0	23,9	1,85
3-405				23-Nov-99	55,9	74,6	NEG
3-450	15	2	ANE	2-Feb-99	18,0	NEG	NEG
3-559				16-Abr-99	13,4	NEG	2,01
3-351	16	2	ROP	4-Nov-98	46,5	NEG	3,48
3-445				2-Feb-99	35,2	21,3	2,17
3-453	17	2	MCOG	4-Feb-99	19,6	54,4	NEG
3-594				27-Abr-99	18,2	NEG	2,20
3-385	18	3	MPT	11-Nov-98	33,2	NEG	NEG
3-489				15-Feb-99	36,1	NEG	1,78
3-570				21-Abr-99	29,7	32,8	NEG
3-401	19	2	MJPC	17-Nov-98	23,6	36,1	2,86
3-513				9-Mar-99	23,2	NEG	NEG
3-417	20	2	CPG	30-Nov-98	24,1	NEG	1,36
3-509				8-Mar-99	26,6	NEG	NEG
3-357	21	3	APD	5-Nov-98	22,5	21,6	NEG
3-465				5-Feb-99	16,5	53,7	NEG
3-574				22-Abr-99	18,7	NEG	1,41
3-377	22	3	VRR	11-Nov-98	44,5	21,8	NEG
3-469				8-Feb-99	39,8	NEG	1,11
3-606				29-Abr-99	27,8	NEG	7,5

Tabla 10. Continuación.

IDENTIFICACIÓN DE LABORATORIO	Nº DE PACIENTE	Nº DE MUESTRAS	INICIALES	FECHA DE EXTRACCIÓN	IgG	IgM	IgA
3-397	23	4	ARP	13-Nov-98	15,6	NEG	NEG
3-476				9-Feb-99	16,8	NEG	4,12
3-477				9-Feb-99	19,0	NEG	4,49
3-590				27-Abr-99	18,7	NEG	1,92
3-361	24	3	ARF	6-Nov-98	22,4	24,2	NEG
3-461				4-Feb-99	16,0	NEG	1,75
3-562				20-Abr-99	12,1	NEG	NEG
3-481	25	2	IRC	10-Feb-99	37,1	NEG	NEG
3-545				13-Abr-99	21,6	NEG	4,74
3-313	26	2	YRG	21-Oct-98	27,8	NEG	4,2
3-537				17-Mar-99	31,8	NEG	NEG
3-347	27	2	TVM	4-Nov-98	23,6	24,8	6,76
3-501				5-Mar-99	16,7	NEG	1,41

Figura 18. Evolución de los anticuerpos IgG anti-VHH-6 en los pacientes con EM del seguimiento serológico.

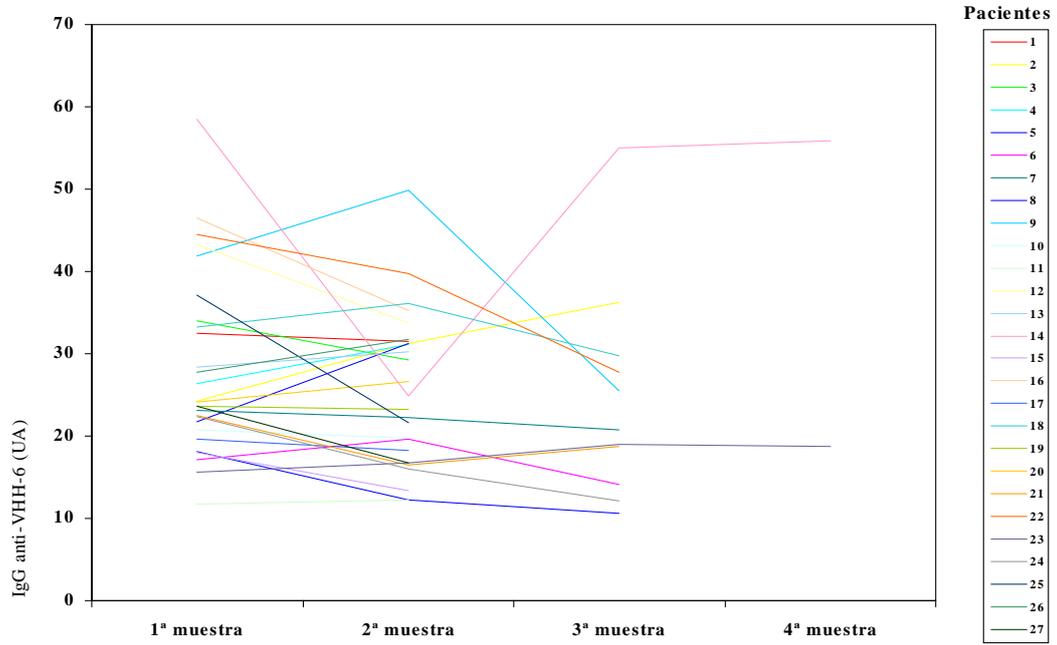


Figura 19. Evolución de los anticuerpos IgM anti-VHH-6 en los pacientes con EM del seguimiento serológico.

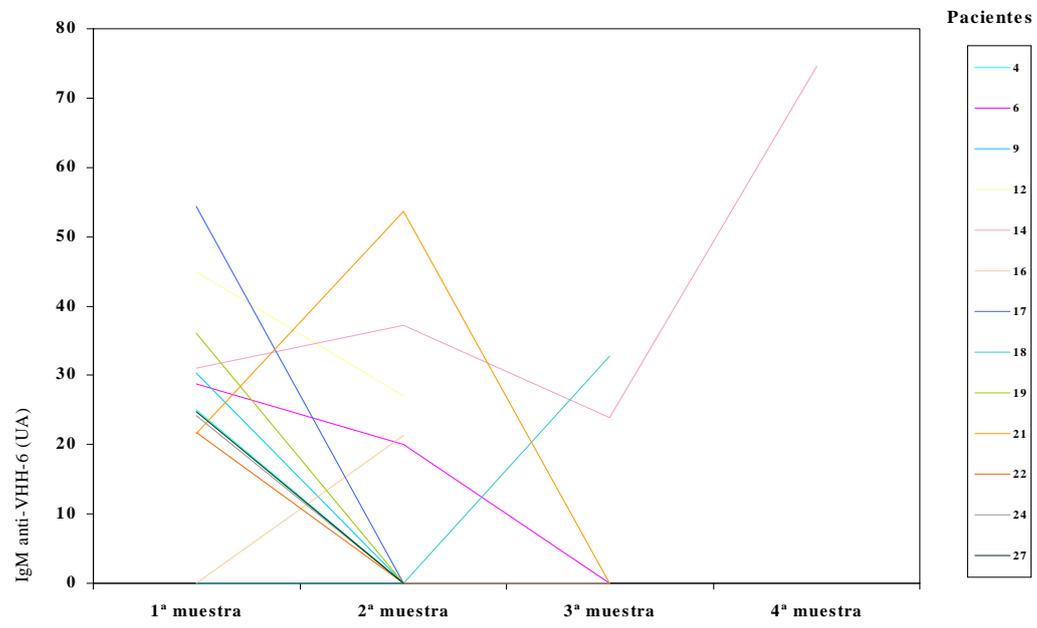
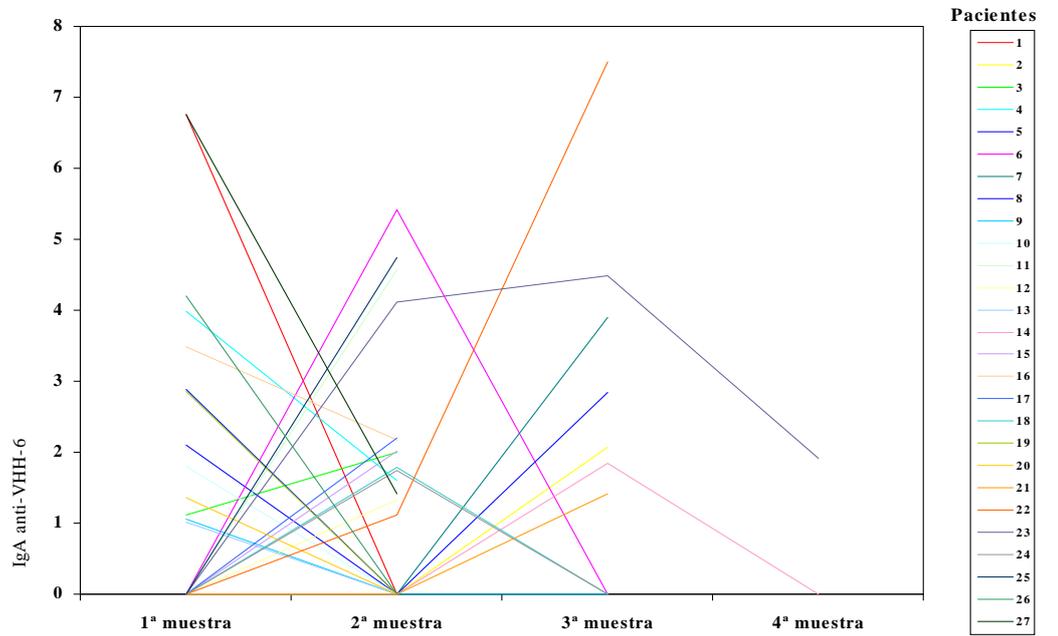


Figura 20. Evolución de los anticuerpos IgA anti-VHH-6 en los pacientes con EM del seguimiento serológico.



II. ESTADÍSTICA

1. Grupo general de enfermos con EM y controles con OEN

En la tabla 11 se refleja la estadística descriptiva aplicada a los resultados obtenidos en los ELISA para la IgG, IgA e IgM frente a VHH-6, CMV y VEB en los grupos I y II. Fueron negativas (en el LCR de los enfermos con EM y controles) la IgM e IgA anti-VHH-6, la IgA anti-CMV y las IgG e IgA anti-VEB. Se ha encontrado una mayor seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-VHH-6 en el grupo I (EM; 53,8 %) frente al grupo II (OEN; 40 %), siendo esta diferencia significativa ($p = 0,026$; T de Student).

En cuanto a las IgG anti-CMV y anti-VEB en suero, no se hallaron diferencias significativas ($p = 0,869$ y $p = 0,955$, respectivamente; T de Student) entre los grupos I y II.

Si se tiene en cuenta la abundancia relativa de anticuerpos en suero, observamos que ésta es mayor para la IgG anti-VHH-6 (18,7 UA, grupo I), seguida de la IgG anti-VEB (290,5 U / ml, grupo I) en los enfermos con EM en comparación con los controles con OEN (13,7 UA y 218,6 U / ml, respectivamente). Para el caso de la IgG anti-CMV, el título medio en los sueros de enfermos con EM es muy similar al de los controles con OEN (11164,3 y 10366,5, respectivamente).

En cuanto a la IgM anti-VHH-6, y las IgG e IgA anti-VEB y anti-CMV, o fueron negativas en los grupos I y II, o los títulos fueron muy similares entre ambos.

Tabla 11. Estadística descriptiva aplicada a los resultados obtenidos en los sueros y LCR de los enfermos con EM (Grupo I) y controles (Grupo II).

IgG VHH-6 suero	Media (UA)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	9,8	34,6	10,7	53,8	0,026
OEN	5,5	10,4	7,2	40,0	
IgG CMV suero	Media (título)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	8459,8	23400	7767,6	78,4	0,869
OEN	8830,8	32270	8743,0	85,2	
IgG VEB suero	Media (UI/ml)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	270,4	796	200	91,9	0,955
OEN	210,5	807	204,2	96,3	
IgM VHH-6 suero	Media (UA)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0	0	0	0	0,575
OEN	0,7	21	3,8	3,3	
IgA VHH-6 suero	Media (UA)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0,8	6,0	2,1	15,6	0,000
OEN	0	0	0	0	
IgA CMV suero	Media (D.O.)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0,5	2,4	1,0	26,5	0,237
OEN	0,4	0,9	0,8	24,1	
IgA VEB suero	Media (D.O.)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0,2	0,5	0,5	14,7	0,474
OEN	0,2	0,5	0,4	13,8	
IgG VHH-6 LCR	Media (UA)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0,3	11,7	1,8	2,4	0,079
OEN	0	0	0	0	
IgG CMV LCR	Media (título)	Rango	Desviación típica (X σ_{n-1})	Porcentaje de positivos	T de Student
EM	0	0	0	0	0,575
OEN	22,8	660	122,6	3,4	

La IgA anti-VHH-6 en suero arrojó unos porcentajes del 15,6 en enfermos con EM, frente al 0% de los controles con OEN ($p < 0,05$; T de Student).

2. Grupo de seguimiento de enfermos con EM

El análisis estadístico del seguimiento (Grupo III) se refleja en la tabla 12. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el curso evolutivo del estudio (test de rangos con signo de Wilcoxon).

3. Histogramas de resultados

En las figuras 21 a 29 se representan los resultados positivos frente a los negativos (tanto por ciento) de cada anticuerpo en los grupos I y II.

3.1. IgG de VHH-6 en suero

Se observa en la figura 21 que muchos de los enfermos con EM presentan IgG frente a VHH-6 en suero (53,8 %), en comparación a los controles (40 %). La media para los enfermos con EM fue de $9,8 \pm 10,6$ UA, y para los controles, de $5,5 \pm 7,2$ UA, existiendo diferencia estadística ($p = 0,026$; T de Student).

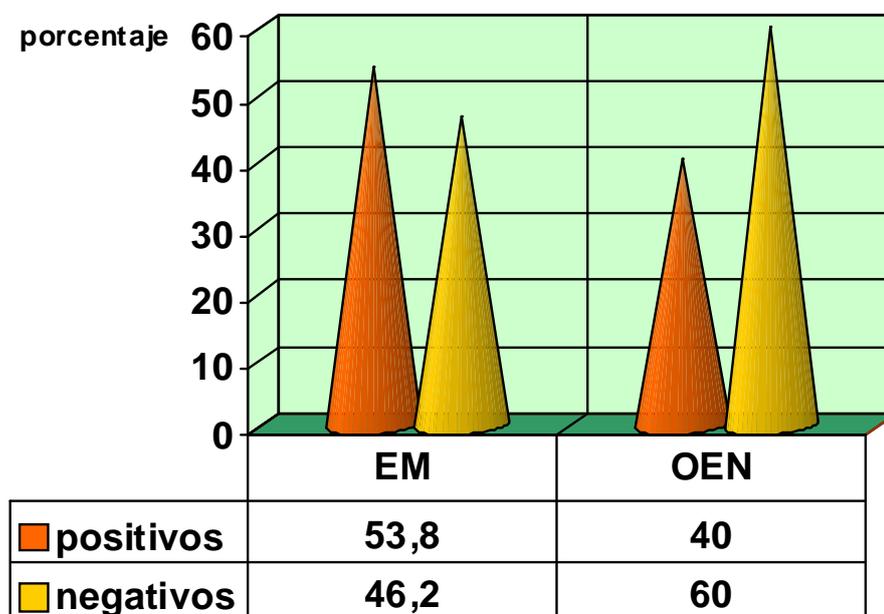
3.2. IgG de VHH-6 en LCR

En la figura 22 se representa el resultado de la IgG anti-VHH-6 en el LCR. Se observa que sólo una muestra (2,4%) de los enfermos con EM fue positiva. Ésta correspondió a una mujer de 38 años con EMRR y 17 años de evolución. La cantidad de proteínas (mg / dl) y células / μ l en el LCR fue de 2 y 57, respectivamente. La media fue de $0,3 \pm 1,9$ UA en los enfermos con EM. No existió diferencia significativa ($p > 0,05$; T de Student).

Tabla 12. Estadística descriptiva aplicada a los resultados de la investigación de anticuerpos anti-VHH-6 en pacientes con EM en los que se realizó el seguimiento serológico.

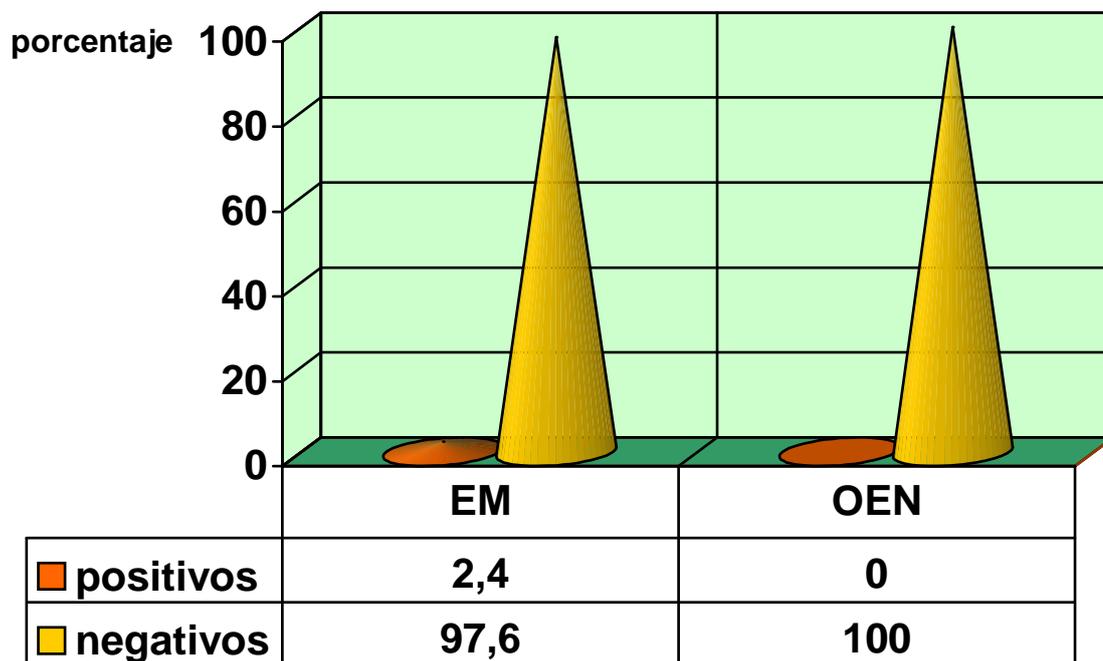
	IgG anti-VHH-6		IgM anti-VHH-6		IgA anti-VHH-6	
	% positivos	Media \pm DE	% positivos	Media \pm DE	% positivos	Media \pm DE
<i>EM (Grupo III)</i>	100	26,8 \pm 11,1	28,4	9,5 \pm 16,9	49,3	1,5 \pm 1,9

Figura 21. Resultados de IgG anti-VHH-6 en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGGHHV6S	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
	Sí	39	9,8000	10,6535	1,7059
	No	30	5,4933	7,1780	1,3105

Figura 22. Resultados de IgG anti-VHH-6 en los LCR de los enfermos de los grupos I y II.



IGGHHV6L	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si		41	,2854	1,8272	,2854
no		31	,0000	,0000	,0000

3.3. IgM de VHH-6 en suero

En la figura 23 se representan los resultados de la IgM anti-VHH-6 en el suero. La IgM no presenta diferencias significativas entre ambos grupos (0 % y 3,3 %, respectivamente; $p > 0,05$; T de Student). La media fue de $1 \pm 4,3$ UA para los enfermos con EM, y de $0,7 \pm 3,8$ UA para los enfermos. El único positivo de los controles correspondió a una mujer de 53 años que padecía hipertensión intracraneal benigna.

3.4. IgM de VHH-6 en LCR

Los resultados fueron negativos en ambos grupos.

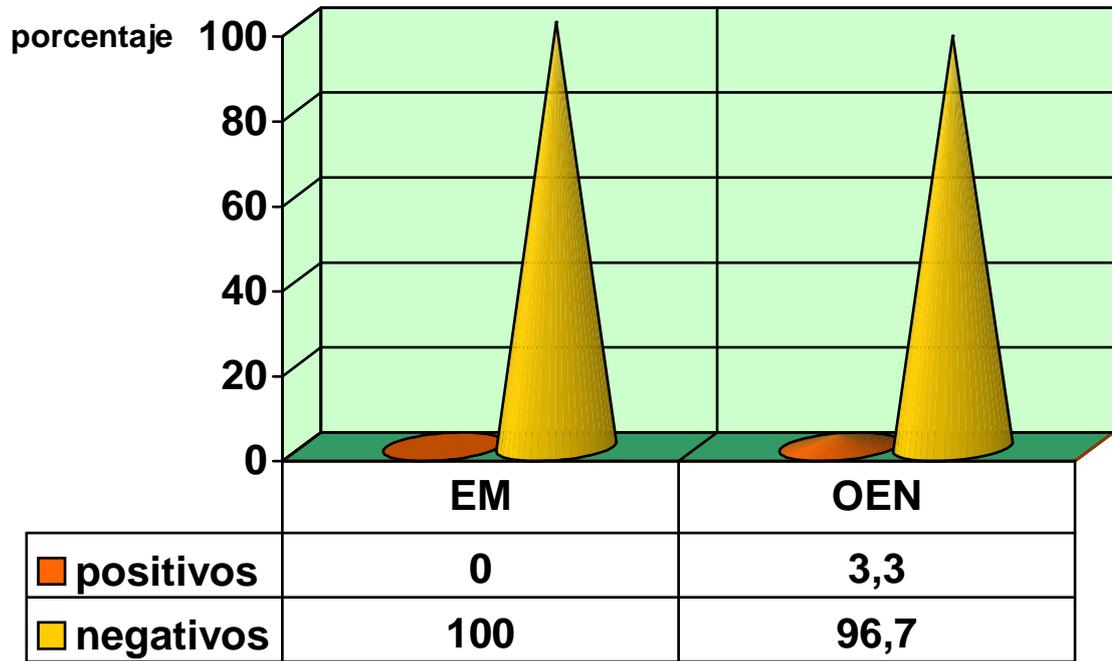
3.5. IgA de VHH-6 en suero

Un 15,6% de enfermos con EM que presenta IgA anti-VHH-6 en suero (figura 24), frente a ningún suero control. Ese 15,6 % correspondió a 4 casos: una mujer de 17 años con EMRR, un hombre de 54 años con EMRR, una mujer de 38 años con EMSP, una mujer de 37 años con EMRR y una mujer de 24 años con EMRR. La media fue de $0,8 \pm 2,1$ para los enfermos. Se encontró una fuerte diferencia estadística ($p = 0,000$; T de Student).

3.6. IgA de VHH-6 en LCR

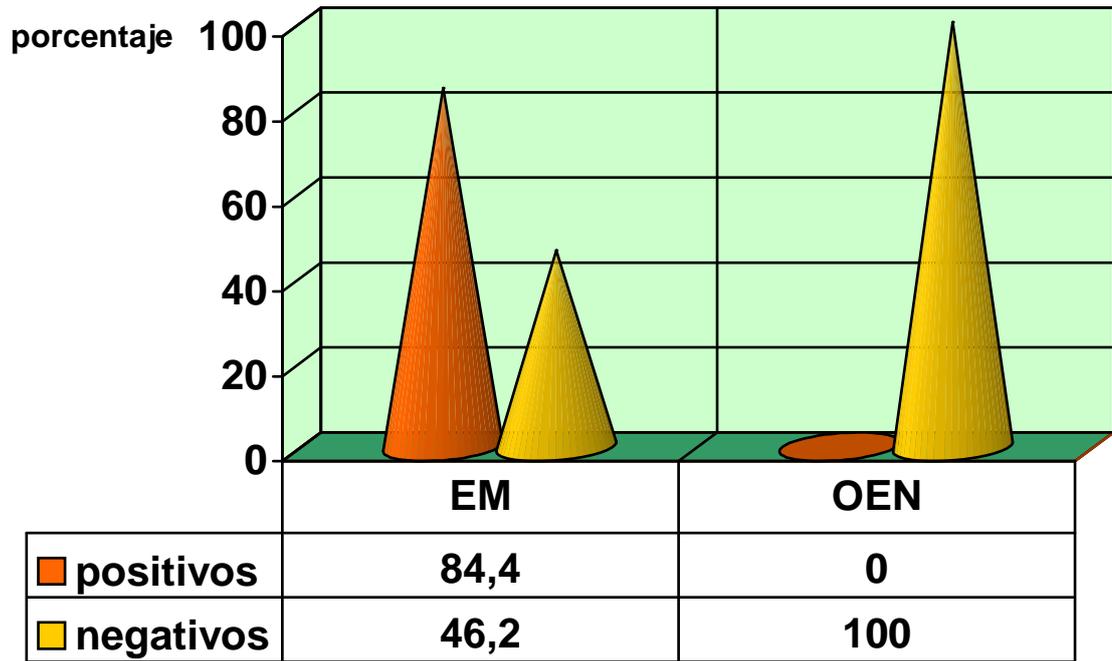
Los resultados fueron negativos en ambos grupos.

Figura 23. Resultados de IgM anti-VHH-6 en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGMHHV6S	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	39	,9821	4,2792	,6852	
no	30	,7000	3,8341	,7000	

Figura 24. Resultados de IgA anti-VHH-6 en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGAHHV6S	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	32	,8053	2,0946	,3703	
no	28	,0000	,0000	,0000	

3.7. IgG de CMV en suero

En la figura 25 se refleja el alto porcentaje de positivos en el grupo de enfermos con EM y en el de los controles (78,4 % y 85,2 %, respectivamente). El título medio fue de $8459,8 \pm 7767,6$ para los enfermos con EM, y de $8830,8 \pm 8743,0$ para los controles. No hubo diferencia estadística entre ambos grupos ($p > 0,05$; T de Student).

3.8. IgG de CMV en LCR

Ningún enfermo con EM tuvo IgG anti-CMV en LCR (figura 26), aunque sí un control (3,4 %), que correspondió a una mujer de 53 años con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. El número de proteínas (mg / dl) y células / μ l en el LCR fue de 1 y 34,4, respectivamente. El título medio para los controles fue de $22,7 \pm 122,5$, sin que hubiera diferencia estadística ($p > 0,05$; T de Student).

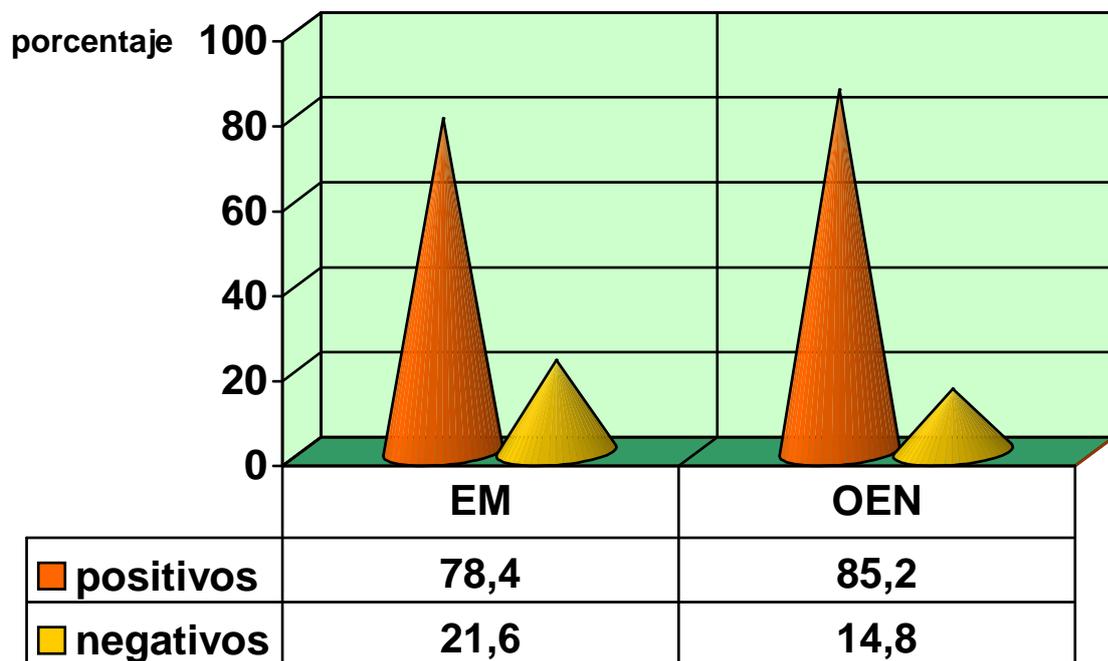
3.9. IgA de CMV en suero

Aproximadamente uno de cada cuatro individuos (26,5 % y 24,1 %; grupo I y II, respectivamente) dio positiva la IgA anti-CMV en suero (figura 27). La media de los resultados fue de $0,5 \pm 1,0$ para los enfermos con EM, y de $0,4 \pm 0,8$ para los controles. No hubo diferencia estadística ($p > 0,05$; T de Student).

3.10. IgA de CMV en LCR

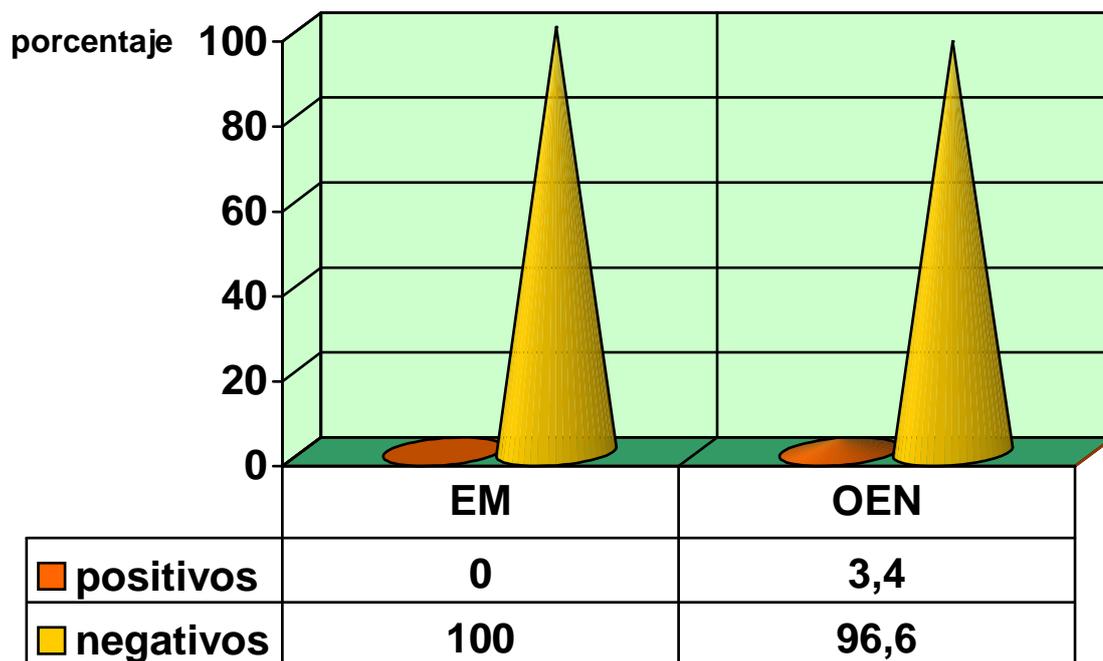
Los resultados fueron negativos en ambos grupos.

Figura 25. Resultados de IgG anti-CMV en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



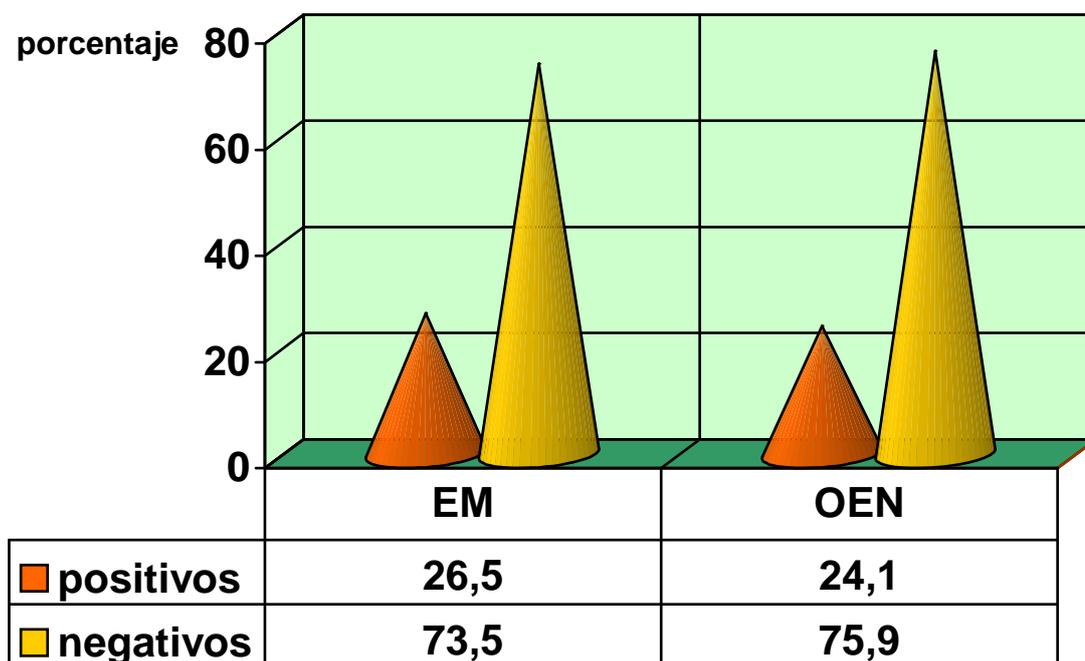
IGGCMVS	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	37	8459,7838	7767,6292	1276,9904	
no	27	8830,7778	8743,0362	1682,5981	

Figura 26. Resultados de IgG anti-CMV en los LCR de los enfermos de los grupos I y II.



IGGCMVL	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	40		,0000	,0000	,0000
no	29		22,7586	122,5589	22,7586

Figura 27. Resultados de IgA anti-CMV en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGACMVS	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	34	,5412	1,0210	,1751	
no	29	,4172	,7677	,1426	

3.11. IgG de VEB en suero

En la figura 28 se observa que más del 90% de los individuos presentan IgG anti-VEB en suero (91,9 % y 96,3 %; grupo I y II, respectivamente). La media fue de $270,4 \pm 200$ UI / ml en los enfermos con EM, y de $210,5 \pm 204,2$ UI / ml en los controles. No se halló diferencia estadística ($p > 0,05$; T de Student).

3.12. IgG de VEB en LCR

Los resultados fueron negativos en ambos grupos.

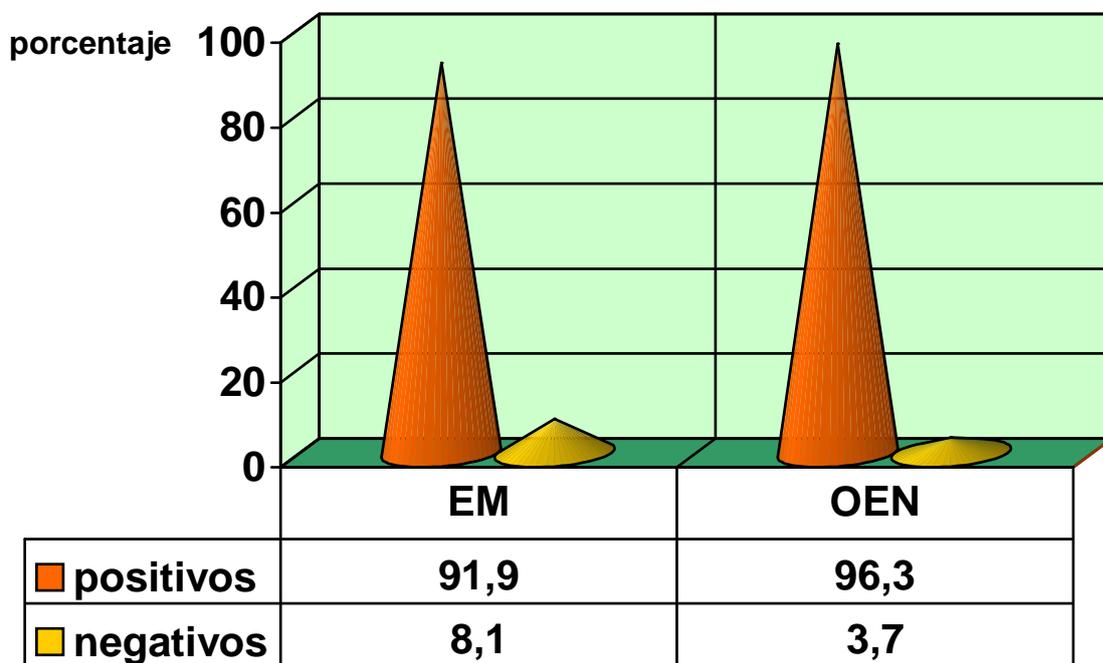
3.13. IgA de VEB en suero

Los resultados obtenidos de IgA anti-VEB en suero son similares en ambos grupos (14,7 % y 13,8 %; grupo I y II, respectivamente), como se refleja en la figura 29. Los valores de extinción medios fueron de $0,2 \pm 0,5$ en los enfermos con EM, y de $0,2 \pm 0,4$ en los controles. No se halló diferencia estadística ($p > 0,05$; T de Student).

3.14. IgA de VEB en LCR

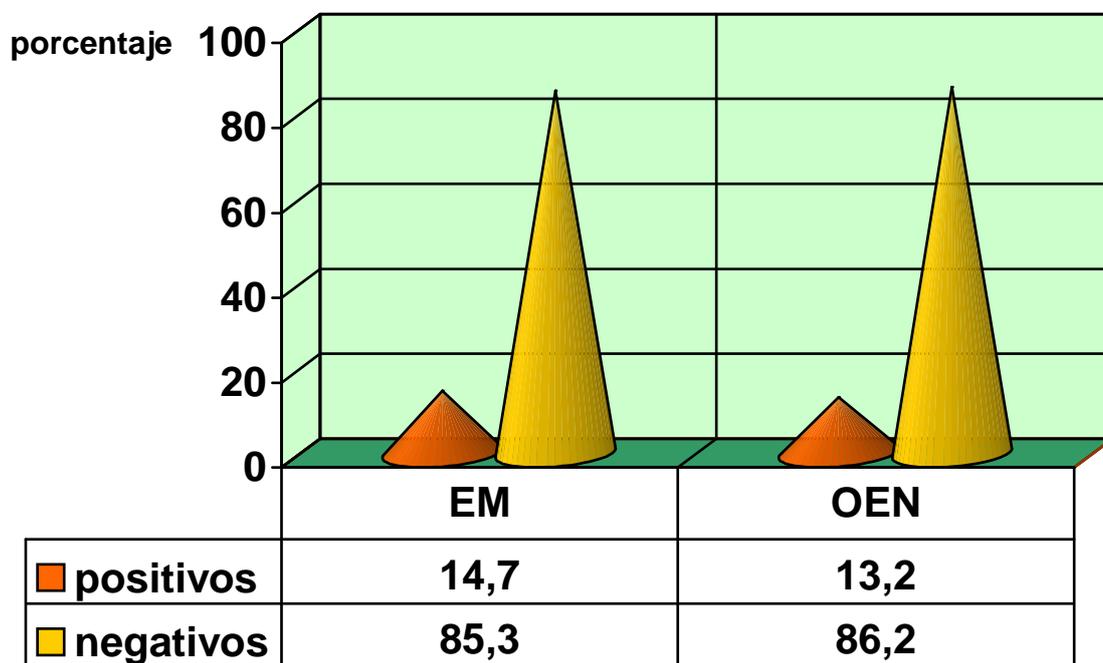
Los resultados fueron negativos en ambos grupos.

Figura 28. Resultados de IgG anti-VEB en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGGVEBS	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
si	37	270,4054	199,8325	32,8523	
no	27	210,4815	204,1889	39,2962	

Figura 29. Resultados de IgA anti-VEB en los sueros de los enfermos de los grupos I y II.



IGAVEBS	EM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
	si	34	,2118	,5221	8,954E-02
	no	29	,1724	,4439	8,243E-02

III. OTROS ESTUDIOS ESTADÍSTICOS APLICADOS AL GRUPO I

1. Correlación entre los niveles de anticuerpos y la edad

Se estudió si existía algún tipo de relación entre la edad de los enfermos del grupo I y la presencia de anticuerpos. A medida que la edad de los pacientes era mayor, no se observó un incremento o decremento paralelo en los niveles de anticuerpos ($p > 0,05$; T de Student).

2. Correlación entre los niveles de anticuerpos y el tiempo de evolución

Se estudió la posible relación entre el tiempo de evolución de los enfermos del grupo I y la presencia de anticuerpos. A medida que el tiempo de evolución era mayor, no se observó un incremento o decremento significativo en los niveles de anticuerpos ($p > 0,05$; T de Student).

3. Correlación entre los niveles de anticuerpos y la escala de discapacidad (EDSS)

Se halló que los niveles de anticuerpos ni se incrementaban ni decrecían significativamente a medida que aumentaba el grado en la escala de discapacidad de los enfermos con EM ($p > 0,05$; T de Student).

4. Correlación entre los niveles de anticuerpos y el sexo

No se observaron diferencias estadísticas en el grupo de enfermos con EM en función del sexo respecto a los niveles de anticuerpos ($p > 0,05$; χ^2 de Pearson).

5. Correlación entre los niveles de anticuerpos y las formas clínicas de la enfermedad

Tampoco se observó que hubiese diferencias significativas en función de la forma clínica de la EM y los niveles de anticuerpos ($p > 0,05$; χ^2 de Pearson).

IV. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO ENTRE LOS GRUPOS I Y III

Cuando se compararon los resultados obtenidos en el grupo III (seguimiento) con los del grupo I (EM) se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en los resultados positivos de IgG (100% vs. 53,8%; figura 30) e IgM (28,4% vs. 0%; figura 31) anti-VHH-6 en suero, no hallándose estas diferencias ($p > 0,05$; T de Student) en los resultados de IgA anti-VHH-6 (49,3% vs. 15,6%).

Figura 30. Comparación de resultados de IgG anti-VHH-6 entre los grupos I y III.

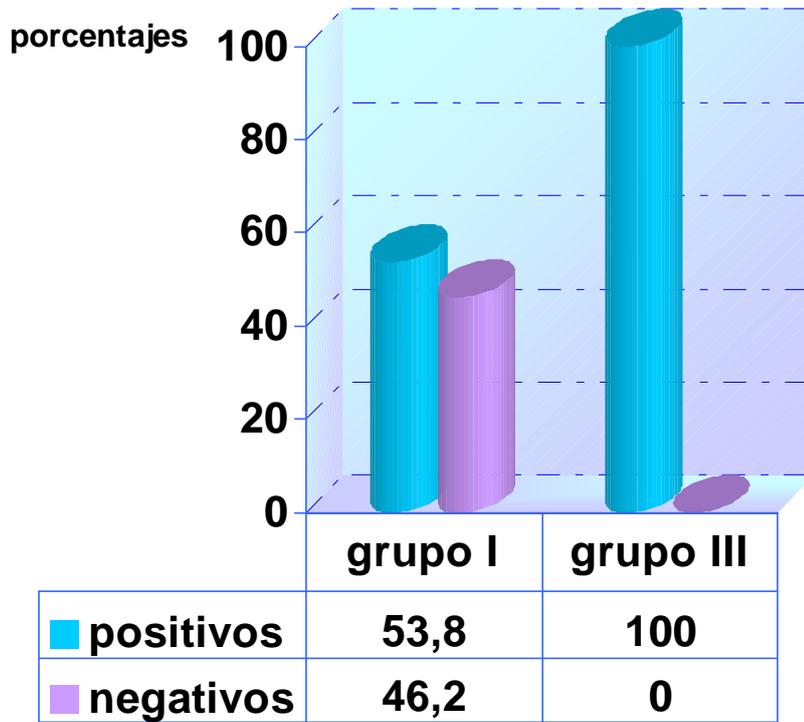
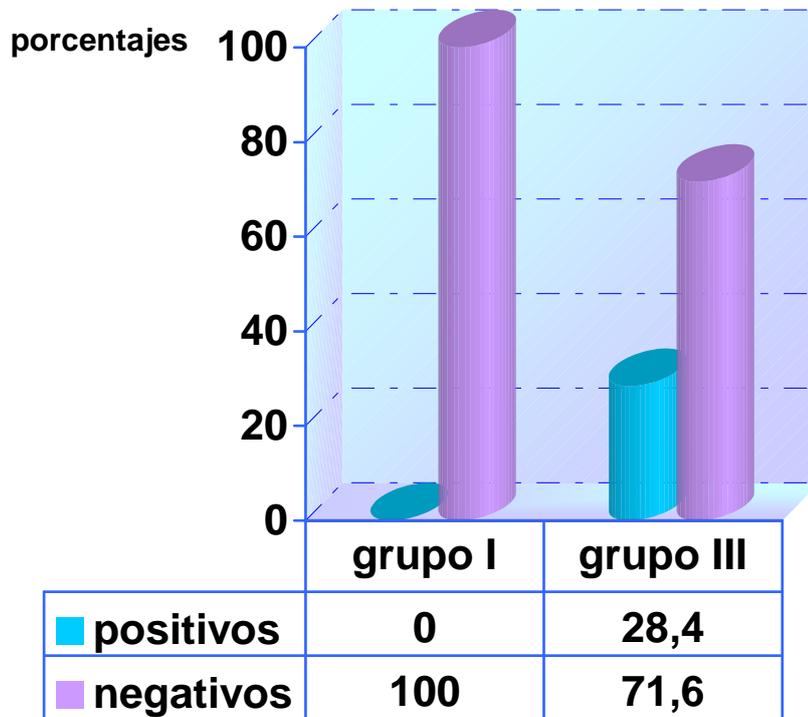


Figura 31. Comparación de resultados de IgM anti-VHH-6 entre los grupos I y III.



V. ESTUDIO ESTADÍSTICO COMPARATIVO ENTRE LOS GRUPOS II Y III

Al comparar los resultados del grupo III (seguimiento) con los del grupo II (OEN) se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en la IgG (100% vs. 40%; figura 32), la IgM (28,4% vs. 3,3%; figura 33) y la IgA (49,3% vs. 0%; figura 34) anti-VHH-6 en suero.

Figura 32. Comparación de resultados de IgG anti-VHH-6 entre los grupos II y III.

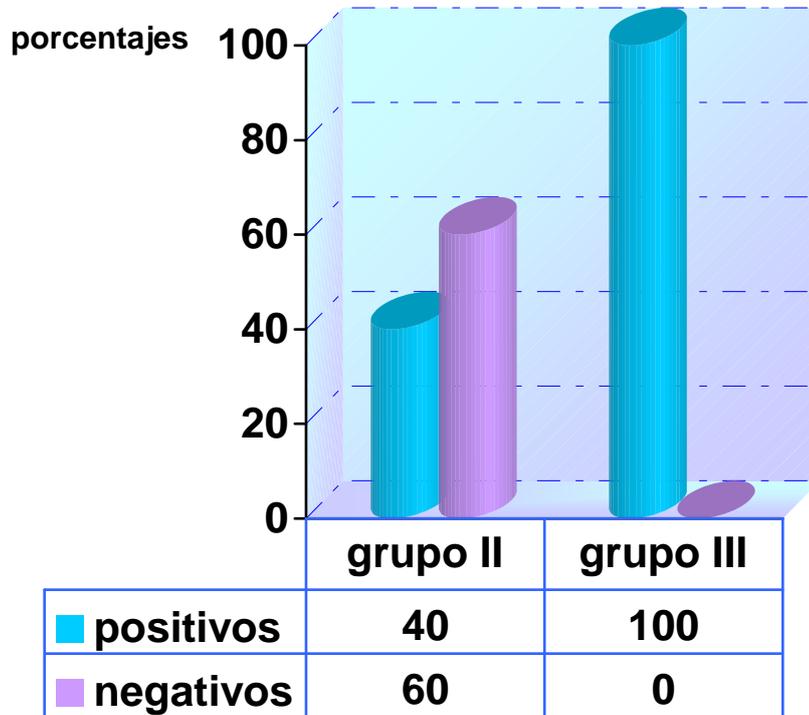


Figura 33. Comparación de resultados de IgM anti-VHH-6 entre los grupos II y III.

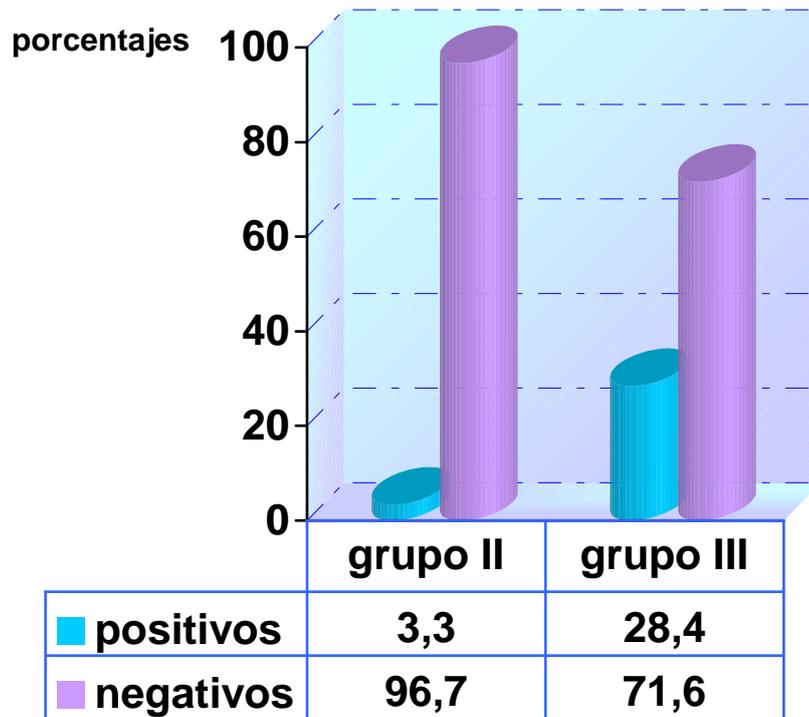
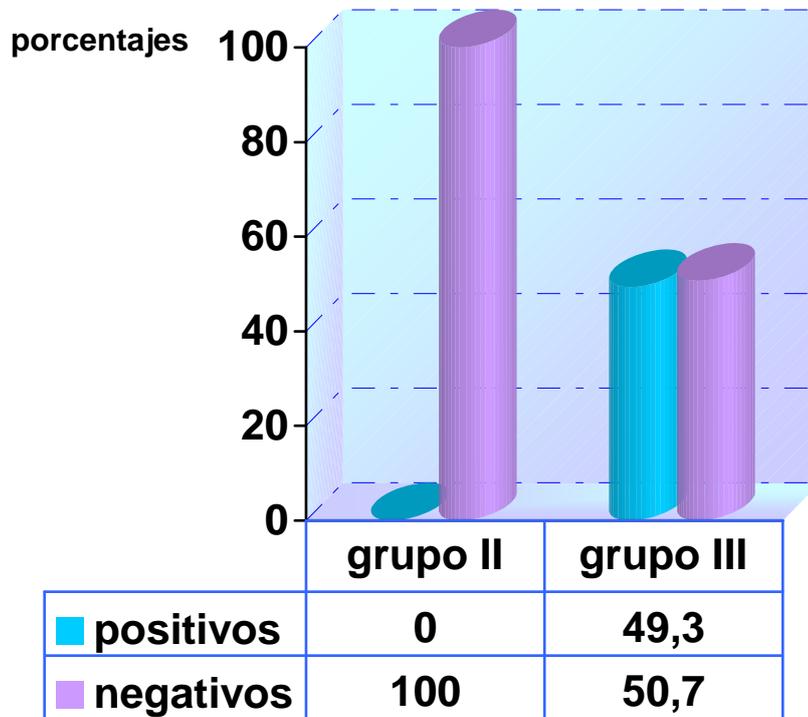


Figura 34. Comparación de resultados de IgA anti-VHH-6 entre los grupos II y III.



DISCUSIÓN

Debido a que no está claramente estudiado el papel que algunos herpes tienen en la aparición o en la persistencia de la EM en el tiempo, en este trabajo se realizan aportaciones, fundamentalmente serológicas, sobre la participación de VHH-6, CMV y VEB. La demostración o la exclusión de ésta serán de gran interés debido ya que se abren nuevas posibilidades terapéuticas.

VHH-6

En nuestro trabajo hemos hallado una seroprevalencia del 53,8 % en la IgG anti-VHH-6 de los enfermos con EM y un 40 % en los controles, que está dentro de los rangos citados por Braun cols., que van desde el 20 al 100%, pero no alcanza las cifras de otros países industrializados (rango del 72 al 95%). Sin embargo, en el seguimiento hallamos el 100% de positivos para la IgG anti-VHH-6 en suero, cifra que sí concuerda con lo publicado por Braun y cols. Además, hallamos diferencias estadísticas entre enfermos (grupo I) y controles (grupo II) ($p = 0,026$; T de Student), diferencias que se hacen más evidentes cuando comparamos los enfermos del seguimiento (grupo III) con los controles (grupo II) ($p = 0,000$; T de Student), semejante a lo publicado por otros autores (Sola y cols., 1993), y que discrepa con los resultados de Nielsen y cols. en 1997, donde no se obtuvieron diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a la IgM anti-VHH-6 en el suero, no se obtuvo ningún resultado positivo en el grupo I de enfermos con EM, si bien dos sueros estuvieron próximos al punto de corte (media de títulos = 19,15 UA), que se correspondieron a una mujer de 46 años con EMRR de 12 años de evolución y a una mujer de 28 años con EMRR de 6 años de evolución. En los controles sólo se obtuvo un resultado positivo próximo al punto de corte (21,0 UA), de una mujer de 53 años con hipertensión intracraneal

benigna. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Soldan y cols. (1997), donde se observaron diferencias significativas de IgM anti-VHH-6 entre sujetos con EMRR y controles ($p = 0,0011$); ni tampoco con los obtenidos por Friedman y cols. (1999), donde la respuesta de IgM en el suero de los enfermos con EM fue del 80% frente al 16% de los controles. Estas diferencias se pueden deber a las diferentes técnicas y bases antigénicas empleadas. Sin embargo, cuando consideramos los resultados hallados en los enfermos del seguimiento serológico, nos aproximamos más a estos resultados: se detectó IgM frente a VHH-6 en el 28,4% de los sueros, frente al 0% del grupo I ($p = 0,003$; T de Student), y el 3,3% del grupo II ($p = 0,006$; T de Student). Pero lo más importante es que los elevados niveles de IgM hallados, en los trabajos anteriormente mencionados, pueden reflejar una estimulación clonal inespecífica de linfocitos B sin que sea una verdadera IgM anti-virus, por lo cual, hubiera sido necesario que estos estudios se completaran con un seguimiento del enfermo para demostrar la elevación de la IgG posterior a la presencia de IgM, tal y como se hizo en nuestro trabajo con los enfermos del grupo III. Efectivamente, se observa en los sueros de los enfermos con EM durante el seguimiento un incremento tanto cualitativo como cuantitativo de la IgG anti-VHH-6 respecto a los enfermos del grupo I y los controles del grupo II: la tasa media de IgG es de $26,8 \pm 11,1$ UA en los sueros de los enfermos del seguimiento, de $9,8 \pm 10,6$ UA en el grupo de enfermos de EM, y de $5,5 \pm 7,2$ UA en el grupo control, hallándose diferencias estadísticas al comparar los grupos de dos en dos ($p < 0,05$; T de Student).

Respecto a la IgA anti-VHH-6 en el suero, fueron positivos el 49,3% de los enfermos del seguimiento, el 15,6% de los enfermos con EM del grupo I, frente al 0 %

de los controles, lo cual puede reflejar reactivación del virus, con o sin significación clínica. Hasta la fecha no se han publicado estudios semejantes.

La IgG frente a VHH-6 en el LCR estuvo presente en el 2,4 % de los enfermos con EM del grupo I, frente a ningún control. Ese porcentaje se correspondió con una mujer de 38 años con EMRR de 17 años de evolución. Este resultado no se pudo valorar debido a que no se pudo saber si correspondió a producción intratecal de anticuerpos. Aún pudiéndose considerar, no se alcanzaron las cifras publicadas por Ongradi y cols. en 1999, donde un 67% y un 44% de los pacientes con EM presentaron IgG anti-VHH-6B e anti-VHH-6A en el LCR, respectivamente, frente a ninguno de los controles. Tampoco coinciden estos resultados con los obtenidos por Ablashi y cols. (1998), que encontraron una frecuencia mucho mayor de IgG, frente a los antígenos tardíos de VHH-6, en los LCR de enfermos con EM (39,4%) que en los controles (7,4%).

La IgM y la IgA anti-VHH-6 en el LCR fueron negativas en todas las muestras. Estos resultados no concuerdan con los resultados de Ongradi y cols. (1999), que hallaron un claro predominio de anticuerpos IgG e IgM frente a VHH-6B (así como frente a VHH-6A y VHH-7) en los LCR de enfermos con EM frente a un grupo control.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en el grupo III (seguimiento) con los del grupo I (EM), se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en cuanto a los resultados de IgG (100% vs. 53,8%) e IgM (28,4% vs. 0%) anti-VHH-6 en suero, no hallándose estas diferencias significativas ($p > 0,05$; T de Student) en los resultados de IgA anti-VHH-6 (49,3% vs. 15,6%), aunque si hubo diferencias notables. Al comparar estos mismos resultados del grupo III con los del grupo control (OEN), se

observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en la IgG (100% vs. 40%), la IgM (28,4% vs. 3,3%) y la IgA (49,3% vs. 0%) anti-VHH-6 en suero.

Cuantitativamente, hubo mayor cantidad de IgG anti-VHH-6 (18,7 UA y 26,8 UA, grupos I y III respectivamente) en los sueros de los enfermos con EM en comparación con la de los controles con OEN (13,7 UA).

Respecto a la PCR, no se hallaron secuencias del genoma de VHH-6 en los sueros y LCR de los enfermos con EM del grupo I y de los controles, resultados similares a los obtenidos por autores como Martín y cols. (1997), los cuales no hallaron el genoma de ningún virus herpes, incluido VHH-6, mediante la realización de una nested PCR a partir de sangre y LCR de pacientes con EM y neuritis óptica. Nuestros resultados también se aproximan a lo publicado por Álvarez y cols. (2000), que cuando emplearon una PCR convencional no consiguieron obtener ningún resultado positivo en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los enfermos con EM y controles. Además, nuestros resultados no se pueden atribuir a la inhibición de la PCR, ya que para cada una de las muestras estudiadas en nuestro trabajo se amplificó y se detectó el gen del virus Aujeszky empleado como control interno.

Estos resultados negativos se pueden justificar en base a las diferentes muestras de partida para la PCR, ya que cuando se emplean CMSP se obtiene un elevado porcentaje de positivos. Sin embargo, se ha visto que los resultados obtenidos a partir de CMSP carecen de valor, puesto que VHH-6 puede establecer latencia en CMSP o glándulas salivares (Kondo y cols., 1991, Luppi y cols., 1993_a; Sada y cols., 1996), por lo que la detección de ADN en estas muestras clínicas no diferencia entre infección activa y latencia o persistencia por VHH-6. Lo mismo sucede con el tejido cerebral; dado el

marcado neurotropismo de VHH-6, no es de extrañar que cualquier individuo infectado albergue el virus en este tejido, ya sea en las neuronas o en las células mononucleares adyacentes. Por lo tanto, los resultados positivos en este sentido tampoco pueden ser valorables. Para discriminar el estado de la infección son más apropiadas las muestras de suero o plasma, tal y como se refleja en este trabajo (Osiowy y cols. 1998).

También hay que tener en cuenta la posibilidad de que este virus, al reactivarse, produzca encefalitis, evento que no tiene traducción en el LCR, al contrario que las meningitis. Es posible que esta sea la causa de que no obtuviéramos ningún resultado positivo en el LCR en nuestro estudio. Todo esto se pone de manifiesto en un trabajo (Taus y cols., 2000) en el que no se detectó ADN vírico (VHH-6 y VHH-7) en ninguna muestra de LCR, y la frecuencia de ADN de VHH-6 detectado en las CMSP no fue diferente de forma significativa entre enfermos con EM y los controles. Por último, apoyando este hecho, se ha visto que no existe correlación entre la detección de ADN y el estado serológico en los individuos de más de dos años de edad (Osiowy y cols. 1998).

CMV Y VEB

La IgG anti-CMV en el suero arroja resultados (75,7 % vs. 85,2 %) que concuerdan con lo obtenido por Myhr y cols. (1998), los cuales no hallaron diferencias estadísticas entre grupos de enfermos y sanos.

Respecto a la IgG frente a VEB en suero, los resultados obtenidos (91,9 % vs. 96,3 %) se asemejan a lo publicado por autores como Munch y cols. (1998) y Myhr y cols. (1998), cuyos resultados fueron del 99,3% y el 100 % en los enfermos con EM,

frente al 89,9% y el 95,3% en los controles, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas. En un trabajo publicado en *Neurology*, la seroprevalencia frente a VEB en los pacientes con EM fue del 100%, frente a un 90,1% de los controles, no encontrándose signos de primoinfección en ningún paciente con EM, frente al 3,7% de los controles sanos. Concluyeron que la infección por el VEB podría ser un prerrequisito más que una consecuencia de la EM (Wandinger y cols., 2000).

Respecto a la cifra de IgG anti-CMV y anti-VEB, los títulos medios en los sueros de enfermos con EM del grupo I (11164,3 y 290,5 UI / ml, respectivamente) son muy similares a los de los controles con OEN del grupo II (10366,5 y 218,6 UI / ml, respectivamente).

Del mismo modo, las IgA anti-CMV (25,5 y 24,1%) y anti-VEB (14,7 y 13,8%) en el suero no presentan diferencias significativas entre grupos. En el mismo trabajo anteriormente mencionado, se observaron respuestas elevadas de IgM e IgA frente a los antígenos tempranos de VEB en el 72,7% de los pacientes con EM, durante un período de seguimiento de un año (Wandinger y cols., 2000). Dado que nosotros no analizamos la IgM e IgA en el grupo III, no podemos comparar este dato.

La IgG anti-CMV en el LCR fue positiva en tan sólo una muestra del grupo control, que se correspondió con una mujer de 53 años con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. Este resultado no se pudo valorar debido a que no se pudo estudiar la producción intratecal de anticuerpos. Aún pudiéndose considerar, el resultado obtenido no concuerda con los obtenidos en 1990 por Izquierdo y cols., ya que demostraron la existencia de síntesis intratecal de anticuerpos anti-CMV mediante inmunofluorescencia.

La IgA anti-CMV en el LCR fue negativa en todas las muestras. Hasta la fecha no se han publicado estudios semejantes. La IgG y la IgA anti-VEB en el LCR también fueron negativas en todas las muestras. Los resultados no concuerdan con los derivados de los trabajos de Rand y cols. en 2000, ya que hallaron anticuerpos en el LCR de los pacientes con EM frente al antígeno EBNA-1 de VEB.

DISCUSIÓN

Debido a que no está claramente estudiado el papel que algunos herpes tienen en la aparición o en la persistencia de la EM en el tiempo, en este trabajo se realizan aportaciones, fundamentalmente serológicas, sobre la participación de VHH-6, CMV y VEB. La demostración o la exclusión de ésta será de gran interés debido ya que se abren nuevas posibilidades terapéuticas.

VHH-6

En nuestro trabajo hemos hallado una seroprevalencia del 53,8 % en la IgG anti-VHH-6 de los enfermos con EM del grupo I y un 40 % en los controles (grupo II), lo que está dentro de los rangos citados por Braun cols., que van desde el 20 al 100%, pero no alcanza las cifras observadas en otros países industrializados (rango del 72 al 95%). Sin embargo, en el seguimiento (grupo III) hallamos el 100% de positivos para la IgG anti-VHH-6 en suero, cifra que sí concuerda con la bibliografía anteriormente citada. Además, hallamos diferencias estadísticas entre enfermos del grupo I y controles del grupo II ($p = 0,026$; T de Student), que se hacen más evidentes cuando comparamos los enfermos del seguimiento con los controles ($p = 0,000$; T de Student), semejante a los resultados obtenidos por otros autores (Sola y cols., 1993), y que discrepa con los publicados por Nielsen y cols. en 1997, que no obtuvieron diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a la IgM anti-VHH-6 en el suero, no se obtuvo ningún resultado positivo en el grupo I de enfermos con EM, si bien dos sueros estuvieron próximos al punto de corte (media de títulos = 19,15 UA), los cuales correspondieron a una mujer de 46 años con EMRR tras 12 años de evolución y a otra mujer de 28 años con EMRR tras 6 años de evolución. En los controles sólo se obtuvo un resultado positivo próximo al

punto de corte (21,0 UA), correspondiente a una mujer de 53 años con hipertensión intracraneal benigna. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Soldan y cols. (1997), donde se observaron diferencias significativas en la IgM anti-VHH-6 entre un grupo de sujetos con EMRR y un grupo control ($p = 0,0011$); ni tampoco con los obtenidos por Friedman y cols. (1999), donde la respuesta de IgM en el suero de los enfermos con EM fue del 80% frente al 16% de los controles. Estas diferencias se pueden deber a las diferentes técnicas y bases antigénicas empleadas. Sin embargo, cuando consideramos los resultados hallados en los enfermos del seguimiento serológico, nos aproximamos algo más a estos resultados: se detectó IgM frente a VHH-6 en el 28,4% de los sueros, frente al 0% del grupo I ($p = 0,003$; T de Student), y el 3,3% del grupo II ($p = 0,006$; T de Student). Pero lo más importante es que los elevados niveles de IgM hallados en los trabajos anteriormente mencionados pueden reflejar una estimulación clonal inespecífica de linfocitos B, sin que sea una verdadera IgM anti-virus, por lo cual hubiera sido necesario que estos estudios se completaran con un seguimiento del enfermo para demostrar la elevación de la IgG posterior a la presencia de IgM, tal y como se hizo en nuestro trabajo con los enfermos del grupo III. Efectivamente, se observa en los sueros de los enfermos con EM durante el seguimiento un incremento tanto cualitativo como cuantitativo de la IgG anti-VHH-6 respecto a los enfermos del grupo I y los controles del grupo II: la tasa media de IgG es de $26,8 \pm 11,1$ UA en los sueros de los enfermos del seguimiento, de $9,8 \pm 10,6$ UA en el grupo de enfermos de EM, y de $5,5 \pm 7,2$ UA en el grupo control, hallándose diferencias estadísticas al comparar los grupos de dos en dos ($p < 0,05$; T de Student).

Respecto a la IgA anti-VHH-6 en el suero, fueron positivos el 49,3% de los enfermos del seguimiento, el 15,6% de los enfermos con EM del grupo I y el 0 % de los controles, lo cual puede reflejar reactivación del virus, con o sin significación clínica. Hasta la fecha no se han publicado estudios semejantes.

La IgG frente a VHH-6 en el LCR estuvo presente en el 2,4 % de los enfermos con EM del grupo I, frente a ningún control. Ese porcentaje se correspondió con una mujer de 38 años con EMRR tras 17 años de evolución. Este resultado no se pudo valorar debido a que no fue posible determinar la producción intratecal de anticuerpos. Aún pudiéndose considerar, no se alcanzaron las cifras publicadas por Ongradi y cols. en 1999, donde un 67% y un 44% de los pacientes con EM presentaron IgG anti-VHH-6B e anti-VHH-6A en el LCR, respectivamente, frente a ninguno de los controles. Tampoco coinciden estos resultados con los obtenidos por Ablashi y cols. (1998), que encontraron una frecuencia mucho mayor de IgG, frente a los antígenos tardíos de VHH-6, en los LCR de enfermos con EM (39,4%) que en los controles (7,4%).

La IgM y la IgA anti-VHH-6 en el LCR fueron negativas en todas las muestras. Estos resultados no concuerdan con los resultados de Ongradi y cols. (1999), que hallaron un claro predominio de anticuerpos IgG e IgM frente a VHH-6B (así como frente a VHH-6A y VHH-7) en los LCR de enfermos con EM frente a un grupo control.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en el grupo de seguimiento con los del grupo I de EM, se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en cuanto a los resultados de IgG (100% vs. 53,8%) e IgM (28,4% vs. 0%) anti-VHH-6 en suero, no hallándose estas diferencias significativas ($p > 0,05$; T de Student) en los resultados de IgA anti-VHH-6 (49,3% vs. 15,6%), aunque si hubo diferencias notables.

Al comparar estos mismos resultados del grupo III con los del grupo control, se observaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$; T de Student) en la IgG (100% vs. 40%), la IgM (28,4% vs. 3,3%) y la IgA (49,3% vs. 0%) anti-VHH-6 en suero.

Cuantitativamente, hubo mayor cantidad de IgG anti-VHH-6 (18,7 UA y 26,8 UA, grupos I y III, respectivamente) en los sueros de los enfermos con EM en comparación con la de los controles con OEN (13,7 UA).

Respecto a la PCR, no se hallaron secuencias del genoma de VHH-6 en los sueros y LCR de los enfermos con EM del grupo I y de los controles, resultados similares a los obtenidos por autores como Martín y cols. (1997), que tampoco hallaron el genoma de ningún herpes, incluido VHH-6, mediante la realización de una nested PCR a partir de sangre y LCR de pacientes con EM y neuritis óptica. Nuestros resultados también se aproximan a lo publicado por Álvarez y cols. (2000), que cuando emplearon una PCR convencional no consiguieron obtener ningún resultado positivo en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los enfermos con EM y controles. Además, nuestros resultados no se pueden atribuir a la inhibición de la PCR, ya que para cada una de las muestras estudiadas en nuestro trabajo se amplificó y se detectó el gen del virus Aujeszky empleado como control interno.

Estos resultados negativos se pueden justificar en base a las diferentes muestras de partida para la PCR, ya que cuando se emplean CMSP se obtiene un elevado porcentaje de positivos. Sin embargo, se ha visto que los resultados obtenidos a partir de CMSP carecen de valor, puesto que VHH-6 puede establecer latencia en CMSP o glándulas salivares (Kondo y cols., 1991, Luppi y cols., 1993_a; Sada y cols., 1996), por lo que la detección de ADN en estas muestras clínicas no diferencia entre infección activa y

latencia o persistencia por VHH-6. Lo mismo sucede con el tejido cerebral; dado el marcado neurotropismo de VHH-6, no es de extrañar que cualquier individuo infectado albergue el virus en este tejido, ya sea en las neuronas o en las células mononucleares adyacentes. Por lo tanto, los resultados positivos en este sentido tampoco pueden ser valorables. Para discriminar el estado de la infección son más apropiadas las muestras de suero o plasma, tal y como se refleja en este trabajo (Osiowy y cols. 1998).

También hay que tener en cuenta la posibilidad de que este virus, al reactivarse, produzca encefalitis, evento que no tiene traducción en el LCR, al contrario que las meningitis. Esta puede ser la causa de que tampoco obtuviéramos resultados positivos en los LCR de nuestro estudio. Todo esto se pone de manifiesto en un trabajo (Taus y cols., 2000) en el que no se detectó ADN vírico (VHH-6 y VHH-7) en ninguna muestra de LCR, y la frecuencia de ADN de VHH-6 detectado en las CMSP no fue diferente de forma significativa entre enfermos con EM y los controles. Por último, apoyando este hecho, se ha visto que no existe correlación entre la detección de ADN y el estado serológico en los individuos de más de dos años de edad (Osiowy y cols. 1998).

CMV Y VEB

La IgG anti-CMV en el suero arroja resultados (75,7 % vs. 85,2 %) que concuerdan con lo obtenido por Myhr y cols. (1998), los cuales no hallaron diferencias estadísticas entre grupos de enfermos y sanos.

Respecto a la IgG frente a VEB en suero, los resultados obtenidos (91,9 % vs. 96,3 %) se asemejan a lo publicado por autores como Munch y cols. (1998) y Myhr y cols. (1998), cuyas cifras fueron del 99,3% y el 100 % en los enfermos con EM, frente

al 89,9% y el 95,3% en los controles, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas. En un trabajo publicado en *Neurology*, la seroprevalencia frente a VEB en los pacientes con EM fue del 100%, frente a un 90,1% de los controles, no encontrándose signos de primoinfección en ningún paciente con EM, frente al 3,7% de los controles sanos. Concluyeron que la infección por VEB podría ser un prerrequisito más que una consecuencia de la EM (Wandinger y cols., 2000).

Respecto a la cifra de IgG anti-CMV y anti-VEB, los títulos medios en los sueros de enfermos con EM del grupo I (11164,3 y 290,5 UI / ml, respectivamente) son muy similares a los de los controles del grupo II (10366,5 y 218,6 UI / ml, respectivamente).

Del mismo modo, las IgA anti-CMV (25,5 y 24,1%) y anti-VEB (14,7 y 13,8%) en el suero no presentan diferencias significativas entre los grupos I y II. En el mismo trabajo anteriormente mencionado, se observaron respuestas elevadas de IgM e IgA frente a los antígenos tempranos de VEB en el 72,7% de los pacientes con EM, durante un período de seguimiento de un año (Wandinger y cols., 2000). Dado que nosotros no analizamos la IgM e IgA en el grupo III, no podemos comparar este dato.

La IgG anti-CMV en el LCR fue positiva en tan sólo una muestra del grupo control, que se correspondió con una mujer de 53 años con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. Este resultado no se pudo valorar debido a que no se pudo estudiar la producción intratecal de anticuerpos. Aún pudiéndose considerar, el resultado obtenido no concuerda con los obtenidos en 1990 por Izquierdo y cols., ya que demostraron la existencia de síntesis intratecal de anticuerpos anti-CMV mediante inmunofluorescencia.

La IgA anti-CMV en el LCR fue negativa en todas las muestras. Hasta la fecha no se han publicado estudios semejantes. La IgG y la IgA anti-VEB en el LCR también fueron negativas en todas las muestras. Los resultados no concuerdan con los derivados de los trabajos de Rand y cols. en 2000, ya que hallaron anticuerpos en el LCR de los pacientes con EM frente al antígeno EBNA-1 de VEB.

CONCLUSIONES

1ª) Se obtuvo un resultado negativo en la prueba de ADN de herpes tipo 6 en todas las muestras de suero y líquido cefalorraquídeo cuando se realizó el estudio de corte de los enfermos. Esto se puede deber a una actividad vírica en cantidad insuficiente como para ser detectada en ese momento.

2ª) Se halló una elevación significativa de los anticuerpos IgM e IgA frente al herpes tipo 6 en los pacientes con esclerosis múltiple, lo que se puede deber a una replicación de la partícula vírica en una fase anterior en el tiempo, como se corrobora en el estudio de seguimiento de los enfermos.

3ª) Los anticuerpos IgG frente al herpes tipo 6 estuvieron presentes de forma significativa en los enfermos con esclerosis múltiple, tanto en el estudio de corte como en el seguimiento. Este dato habla a favor de una replicación previa de la partícula vírica en un momento más o menos lejano en el tiempo y apoya la hipótesis de que la síntesis incrementada de IgM e IgA corresponde a un estímulo inducido por la replicación y no se debería a un estímulo clonal inespecífico.

4ª) No se ha encontrado síntesis intratecal de anticuerpos IgG, IgM e IgA en los enfermos con esclerosis múltiple. Esto se puede deber a la lentitud de la síntesis de los anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo, lo que hubiera requerido nuevas muestras para ser evaluadas.

5ª) Con relación a la infección por citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, no se han detectado diferencias significativas en los enfermos con esclerosis múltiple que hagan suponer la existencia de una replicación de estos virus.

6ª) No se observan diferencias significativas entre las tasas de anticuerpos halladas frente a los tres virus y la forma clínica de esclerosis múltiple.

7ª) El hecho de que las tasas de anticuerpos frente al herpes tipo 6 sean mayores en los sueros de los enfermos con esclerosis múltiple, comparado con las tasas de los anticuerpos frente a citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, podría indicar que esta respuesta humoral incrementada frente al herpes tipo 6 no es un mero efecto de los desórdenes asociados a la EM, si no más bien un cofactor de los mismos, ya que, en el caso contrario, se verían incrementadas todas las respuestas de anticuerpos de forma inespecífica.

8ª) Dado que hubo diferencia serológica para los anticuerpos frente al herpes tipo 6 en enfermos con esclerosis múltiple, que se hizo más patente en el seguimiento serológico, no se puede descartar que una reactivación de la infección por el herpes tipo 6 pueda ser el factor ambiental que, junto con la predisposición genética individual, alteraría el normal funcionamiento del sistema inmunológico, provocando una respuesta autoinmune que dé origen a la inflamación y la desmielinización características de la EM.

BIBLIOGRAFÍA

- ABLASHI DV. 1995. Personal communication.
- ABLASHI DV y cols. 1987. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature*. 329: 207.
- ABLASHI DV y cols. 1989. Utilisation of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterisation of HBLV (human herpesvirus 6). *Dev Bio Stand*. 70: 139-146.
- ABLASHI DV y cols. 1991. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 184: 545-552.
- ABLASHI DV y cols. 1993. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch Virol*. 129: 363-366.
- ABLASHI DV y cols. 1998. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler*. 4: 490-496.
- ABLASHI DV y cols. 2000. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS), and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Virol*. 16: 179-191.
- ACHIM CL y cols. 1994. Brain viral burden in HIV infection. *J Neuropathol Exp Neurol*. 53: 284-294.
- ADAMS O y cols. 1998. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J Infect Dis*. 178: 544-546.
- AGULNICK AD y cols. 1994. An ATF/CREB site is the major regulatory element in the human herpesvirus 6 DNA polymerase promoter. *J Virol*. 68: 2970-2977.
- AGUT H y cols. 1988. Concomitant infection by human herpesvirus 6, HTLV-1, and HIV-2. *Lancet*. i: 712.
- AGUT H y cols. 1989_a. In vitro sensitivity of human herpesvirus-6 to antiviral drugs. *Res Virol*. 140: 219-228.
- AGUT H y cols. 1989_b. Susceptibility of human herpesvirus 6 to acyclovir and ganciclovir. *Lancet*. ii: 626.
- AGUT H y cols. 1991. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvirus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis*. 163: 1382-1383.
- AKASHI K y cols. 1993. Severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in a adult. *N Engl J Med* 329: 168-171.
- AKESSON-JOHANSSON A y cols. 1990. Inhibition of human herpesvirus 6 replication by 9-[4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)butyl]guanine (2HM-HBG) and other antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 2417-2419.
- ALBRECHT JC y cols. 1989. The herpes simplex virus immediate-early protein, ICP4, is required to potentiate replication of human immunodeficiency virus in CD4+ lymphocytes. *J Virol*. 63: 1861-1868.

- ALBRECHT JC y cols. 1992. Primary structure of the herpesvirus sairimi genome. *J Virol.* 66: 5047-5058.
- ALBRIGHT AV y cols. 1998. The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *J Neuroviol.* 4: 486-494.
- ALEXANDER FE y cols. 1995. Case clustering, Epstein-Barr virus Reed-Sterberg cell status, and herpesvirus serology in Hodgkin's disease: results of a case-control study. *Eur J Cancer.* 31: 1479-1486.
- ÁLVAREZ R y cols. 2000. Determinación de genomas de virus de la familia Herpesviridae en enfermos de esclerosis múltiple, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Enf Infec Microbiol Clin.* 18: 223-228.
- AMBROZIAK JA y cols. 1995. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science.* 268: 582.
- ANDERS DG y cols. 1992. Boundaries and structure of human cytomegalovirus *oriLyt*, a complex origin for lytic phase DNA replication. *J Virol.* 66: 3373-3384.
- ANDERSON RA y cols. 1996. Definition of a human herpesvirus-6 betaherpesvirus-specific domain in glycoprotein gH that governs interaction with glycoprotein gL: substitution of human cytomegalovirus glycoproteins permits group-specific complex formation. *Virology.* 217: 517-526.
- APPLETON AL y cols. 1994. Human herpesvirus 6 DNA in skin biopsy tissue from marrow graft recipients with severe combined immunodeficiency. *Lancet.* 344: 1361-1362.
- ARAUJO JC y cols. 1995. Human herpesvirus 6A suppresses both transformation by H-ras and transcription by the H-ras and human immunodeficiency virus type 1 promoters. *J Virol.* 69: 4933-4940.
- ASANO Y y cols. 1989_a. Human herpesvirus type 6 infection (exanthem subitum) without fever. *J Pediatr.* 115: 265-265.
- ASANO Y y cols. 1989_b. Viremia and neutralising antibody response in infants with exanthem subitum. *J Pediatr.* 114: 535-539.
- ASANO Y y cols. 1990_a. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG antibody to human herpesvirus 6. *J Med Virol.* 32: 119-123.
- ASANO Y y cols. 1990_b. Fatal fulminant hepatitis in a infant with human herpesvirus-6 infection. *Lancet.* 335: 862-863.
- ASANO Y y cols. 1991_a. Severity of human herpesvirus-6 viremia and clinical findings in infants with exanthema subitum. *J Pediatr.* 118: 891-895.
- ASANO Y y cols. 1991_b. Simultaneous occurrence of human herpesvirus 6 infection and intussusception in three infants. *Pediatr Infect Dis J.* 10: 335-337.
- ASANO Y y cols. 1992. Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Arch Dis Child.* 67: 1484-1485.

- ASANO Y y cols. 1994. Clinical features of infants with human herpesvirus 6 infection (exanthema subitum, roseola infantum). *Pediatrics*. 93: 104-108.
- ASCHERIO A y MUNCH M. 2000. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology*. 11: 220-224.
- ATKINS GJ y cols. 2000. Transient virus infection and multiple sclerosis. *Rev Med Virol*. 10: 291-303.
- AUBIN JT y cols. 1991. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 29: 367-372.
- AUBIN JT y cols. 1992. Intrauterine transmission of human herpesvirus 6. *Lancet*. 340: 482-483.
- AUBIN JT y cols. 1993. Antigenic y genetic differentiation of two putative types of human herpesvirus 6. *J Virol Methods*. 41: 223-234.
- AZOULAY-CAYLA A. 2000. Is multiple sclerosis a disease of viral origin? *Pathol Biol (Paris)*. 48: 4-14.
- BABOONIAN C y cols. 1990. Antibodies to human herpesvirus-6 in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 33: 1749-1750.
- BALACHANDRA K y cols. 1991. Human herpesvirus 6 (HHV-6) infection and exanthem subitum in Thailand. *Acta Paediatr Jpn*. 33: 434-439.
- BALACHANDRAN N y cols. 1989. Identification of specific proteins for human herpesvirus 6-infected human T cell. *J Virol*. 63: 2835-2840.
- BALACHANDRAN N y cols. 1991. Electrophoretic analysis of human herpesvirus 6 polypeptides immunoprecipitated from infected cells with human sera. *J Infect Dis*. 163: 29-34.
- BAPAT AR y cols. 1989. Identification and some properties of unique DNA polymerase from cells infected with human B-lymphotropic virus. *J Virol*. 63: 1400-1403.
- BARONE SR y cols. 1995. Human herpesvirus-6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr*. 127: 95-97.
- BECKER WB y cols. 1988. Isolation of a new human herpesvirus producing a lytic infection of helper (CD4) T-lymphocytes in peripheral blood lymphocyte cultures-another cause of acquired immunodeficiency? *S Afr Med J*. 74: 610-614.
- BELEC L. 1999. The hypothesis of infectious etiology for idiopathic nervous system diseases: from the postulates of Koch to the criteria of Hill. *Clin Exp Pathol*. 47: 207-213.
- BERENBERG WS y cols. 1949. Roseola infantum. *N Engl J Med*. 241: 253-259.
- BERNEMAN ZN y cols. 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.

- BERTI R y cols. 2000. Extended observations on the association of HHV-6 and multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 6: S85-S87.
- BIBERFELD P y cols. 1987. Ultrastructural characterisation of a new human B-lymphotropic DNA virus (HBLV) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst.* 79: 933-941.
- BIELEKOVA B y cols. 2000. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J Immunol.* 164: 1117-1124.
- BJARTMAR C y cols. 1999. Axonal pathology in myelin disorders. *J Neurocytol.* 28: 383-395.
- BLACK JB y cols. 1989. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J Virol Methods.* 26: 133-145.
- BLACK JB y cols. 1992_a. HHV-6 and HHV-7 seroconversion in children clinically diagnosed with measles and rubella. *Clin Infect Dis.* 23: 1156-1158.
- BLACK JB y cols. 1992_b. Induction of host cell protein synthesis by human herpesvirus 6. *Virus Res.* 22: 13-23.
- BLACK JB y cols. 1993. Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva. *Virus Res.* 29: 91-98.
- BLACK JB y cols. 1996. Evaluation of immunoassays for detection of antibodies to human herpesvirus 7. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3: 79-83.
- BLACK JB y PELLETT PE. 1993. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol.* 3: 217-223.
- BLAZQUEZ MV y cols. 1995. Human herpesvirus-6 and the course of human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 9: 389-394.
- BLUMBERG BM y cols. 2000. The HHV6 paradox: ubiquitous commensal or insidious pathogen? A two-step in situ PCR approach. *J Clin Virol.* 16: 159-178.
- BOGDANOVIC G y cols. 1998. Detection of JC virus in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy but not in CSF samples from patients with herpes simplex encephalitis, enteroviral meningitis, or multiple sclerosis. *J Clin Microbiol.* 36: 1137-1138.
- BORISCH B y cols. 1991. Lymphadenitis and lymphoproliferative lesions associated with the human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virchows Arch.* 61:179-187.
- BOVENZI P y cols. 1993. Human herpesvirus 6 (variant A) in Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 341: 1288-1289.
- BRAUN DK y cols. 1995. Presence and expression of human herpesvirus 6 in peripheral blood mononuclear cells of S100-positive, T cell chronic lymphoproliferative disease. *J Infect Dis.* 171: 1351-1355.
- BRAUN DK y cols. 1997. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev.* 10:521-567.

BRIGGS M y cols. 1988. Age prevalence of antibody to human herpesvirus 6. *Lancet*. i: 1058-1059.

BRITT WJ y ALFORD CA. 1996. Cytomegalovirus. P. 2493-2523. En BN Fields, DM Knipe, and PM Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

BROWN NA y cols. 1988. Fall in the human herpesvirus seropositivity with age. *Lancet*. ii: 396.

BUCHBINDER A y cols. 1989. Human herpesvirus-6 and cross-reactivity with others herpesviruses. *Lancet*. i: 217.

BUCHMEIER MJ y LANE TE. 1999. Viral-induced neurodegenerative disease. *Curr Opin Microbiol*. 2: 398-402.

BUCHWALD D y cols. 1990. A chronic "postinfectious" fatigue syndrome associated with benign lymphoproliferation, B-cell proliferation, and active replication of human herpesvirus-6. *J Clin Immunol*. 10: 335-344.

BURD EM y cols. 1993. Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood*. 81: 1645-1650.

BURNS WH y SANDFORD GR. 1990. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antivirals in vitro. *J Infect Dis*. 162: 634-637.

BURNSTINE RC y PAINE RS. 1959. Residual encephalopathy following roseola infantum. *AMA J Dis Child*. 98: 144-152.

CABRERA-GÓMEZ JA y LÓPEZ-SAURA P. 1999. Avances recientes en el tratamiento de los desórdenes del sistema nervioso con interferón-alfa. *Rev Neurol*. 29: 1225-1235.

CAMPADELLI-FIUME G y cols. 1993. Monoclonal antibodies to glycoprotein B differentiate human herpesvirus 6 into two clusters, variants A and B. *J Gen Virol*. 74:2257-2262.

CAMPADELLI-FIUME G y cols. 1999. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis*. 5: 353-366.

CARRIGAN DR y cols. 1990. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by human herpesvirus 6. *J Infect Dis*. 162: 844-851.

CARRIGAN DR y cols. 1991. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. *Lancet*. 338: 147-149.

CARRIGAN DR y cols. 1996. Subacute leukoencephalitis caused by CNS infection with human herpesvirus-6 manifesting as acute multiple sclerosis. *Neurology*. 47: 145-148.

CARRIGAN DR y KNOX KK. 1994. Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood*. 84: 3307-3310.

CARRIGAN DR y KNOX KK. 1995. Bone marrow suppression by human herpesvirus-6: comparison of the A and B variants of the virus. *Blood*. 86: 835-836.

CARRIGAN DR. 1992. Human herpesvirus-6 and bone-marrow transplantation, p. 281-302. En DV Ablashi, GRF Krueger, and SZ Salahuddin (ed.), Human herpesvirus-6: epidemiology, molecular biology, and clinical pathology, vol. 4. Elsevier Medical Press, Amsterdam, The Netherlands.

CASERTA MT y cols. 1994. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J Infect Dis*. 170: 1586-1589.

CASERTA MT y cols. 1998. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J Pediatr*. 133: 386-389.

CASERTA I y GRANIERI E. 2000. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *J Neurovirol*. 6: S147-S151.

CERMELLI C y cols. 1996. Growth of human herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Virus Res*. 45: 75-85.

CERMELLI C y JACOBSON S. 2000. Viruses and multiple sclerosis. *Viral Immunol*. 13: 255-267.

CLARK DA y cols. 1990. The seroepidemiology of human herpesvirus-6 (HHV-6) from a case-control study of leukaemia and lymphoma. *Int J Cancer*. 45: 829-833.

CLARK DA y cols. 1996. Quantification of human herpesvirus 6 in immunocompetent persons and post-mortem tissues from AIDS patients by PCR. *J Gen Virol*. 77: 2271-2275.

CLARK DA. 2000. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol*. 10: 155-173.

CLERICI M y cols. 1999. Immune responses to antigens of human endogenous retroviruses in patients with acute or stable multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 99: 173-182.

COATES AR y BELL J. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat Med*. 4: 537-538.

COLDBERG-POLEY AM y cols. 1992. Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *J Virol*. 66: 95-105.

COLLANDRE H y cols. 1991. Detection of HHV-6 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 31: 171-179.

CONE RW y cols. 1990. Polymerase chain reaction decontamination: the wipe test. *Lancet*. 336: 686-687.

CONE RW y cols. 1993_a. Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol*. 31: 1262-1267.

CONE RW y cols. 1993_b. Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 329: 156-161.

- CONE RW y cols. 1994. Human herpesvirus 6 and pneumonia. *Leuk Lymphoma* 15: 235-241.
- CONE RW y cols. 1996. Coinfection with human herpesvirus variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol.* 34: 877-881.
- COOK SD y cols. 1995. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease. *Acta Neurol Scand.* 161: 34-42.
- CORBELLINO M y cols. 1993. Disseminated human herpesvirus 6 infection in AIDS. *Lancet.* 342: 1242.
- COUILLARD M y cols. 1992. Evaluation of variables in immunofluorescence procedures for the detection of antibodies against human herpesvirus 6 (HHV-6). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 15: 313-320.
- COYLE PV y cols. 1992. Comparison of three immunoassays for the detection of anti-HHV6. *J Virol Methods.* 38: 283-295.
- CUENDE JL y cols. 1994. High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR. *J Med Virol.* 43: 115-118.
- CHALLONER PB y cols. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 7440-7444.
- CHANG Y y cols. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 266: 1865-1869.
- CHEE MS y cols. 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of the human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 154: 125-169.
- CHEN H y cols. 1992. Absence of antibodies to human herpesvirus-6 in patients with slowly-progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Eur J Epidemiol.* 8: 217-221.
- CHEN M y cols. 1994. Detection of human herpesvirus 6 and human papillomavirus 16 in cervical carcinoma. *Am J Pathol.* 145: 1509-1516.
- CHEN M y cols. 1994. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J Virol.* 68: 1173-1178.
- CHEN RL y cols. 1995. Immunomodulation treatment for childhood virus-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol.* 89: 282-290.
- CHOU S y DENNISON KM. 1991. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralisation-related epitopes. *J Infect Dis.* 163: 1229-1234.
- CHOU S. 1992_a. Comparative analysis of sequence variation in gp116 and gp55 components of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology.* 188: 388-390.

CHOU S. 1992_b. Molecular epidemiology of envelope glycoprotein H of human cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 166: 604-607.

CHOU SW y SCOTT KM. 1990. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 28: 851-854.

CHOUSTERMAN S y cols. 1979. Physical map of the channel catfish virus genome: location of sites for restriction endonucleases EcoRI, HindIII, HpaI, and XbaI. *J Virol.* 31: 73-85.

CHRISTENSEN T y cols. 2000. Molecular characterisation of HERV-H variants associated with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 101:229-238.

DAHL H y cols. 1990. An enzyme immunosorbent assay for IgG antibodies to human herpesvirus 6. *J Virol Methods.* 29: 313-323.

DAIBATA M y cols. 1998. Identification of integrated human herpesvirus 6 DNA in early pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 12: 1002-1004.

DALE JK y cols. 1989. The Inoue-Melnick virus, human herpesvirus type 6, and the chronic fatigue syndrome. *Ann Intern Med.* 110: 92-93.

DAVIS MG y cols. 1987. Immediate-early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 8642-8646.

DEMITRACK MA. 1994. Chronic fatigue syndrome: a disease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Ann Med.* 26: 1-5.

DEWHURST S y cols. 1993 human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J Clin Microbiol.* 31: 416-418.

DEWHURST S y cols. 1993. Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29. *J Virol.* 67: 7680-7683.

DEWHURST S y cols. 1994. Human herpesvirus 6B origin: sequence diversity, requirement for two binding sites for origin-binding protein and enhanced replication from naturally occurring origin multimers. *J Virol.* 68: 6799-6803.

DI LUCA D y cols. 1990. The replication of viral and cellular DNA in human herpesvirus 6-infected cells. *Virology.* 175: 199-210.

DI LUCA D y cols. 1991. Reciprocal in vitro interactions between human herpesvirus-6 and HIV-1 Tat. *AIDS.* 5: 1095-1098.

DI LUCA D y cols. 1992. Characterisation of human herpesvirus 6 strains isolated from patients with exanthem subitum with or without cutaneous rash. *J Infect Dis.* 166: 689.

DI LUCA D y cols. 1994. Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Infect Dis.* 170: 211-215.

DI LUCA D y cols. 1995_a. Human herpesvirus 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J Med Virol.* 45: 462-468.

DI LUCA D y cols. 1995_b. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol.* 33: 1660-1661.

DI LUCA D y cols. 1996. Distribution of HHV-6 variants in human tissues. *Infect Agents Dis.* 5: 203-214.

DOLCETTI R y cols. 1996. Human herpesvirus 6 in human immunodeficiency virus-infected individuals: Association with early histologic phases of lymphadenopathy syndrome but not with malignant lymphoproliferative disorders. *J Med Virol.* 48: 344-353.

DOMÍNGUEZ G y cols. 1996. Physical and genetics maps of the human herpesvirus 7 strain SB genome. *Arch Virol.* 141: 2387-2408.

DORFMANN LJ. 1986. Lake Tahoe mystery disease. *Science.* 243: 623.

DOWNING RG y cols. 1987. Isolation of human lymphotropic herpesviruses from Uganda. *Lancet.* ii: 390.

DRESCHER KM y cols. 2000_a. CD40L is critical for protection from demyelinating disease and development of spontaneous remyelination in a mouse model of multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 10: 1-15.

DRESCHER KM y cols. 2000_b. V(beta)8(+) T cells protect from demyelinating disease in a viral model of multiple sclerosis. *Int Immunol.* 12: 271-80.

DROBYSKI WR y cols. 1993_a. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis.* 167: 735-739.

DROBYSKI WR y cols. 1993_b. Prevalence of human herpesvirus 6 variant A y B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridisation. *J Clin Microbiol.* 31: 1515-1520.

DROBYSKI WR y cols. 1994. Brief report: fatal encephalitis due to a variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med.* 330: 1356-1360.

DUNNE WM y cols. 1992. Seroepidemiological evidence for congenital transmission of human herpesvirus 6. *Lancet.* 340: 121-122.

DUNNE WM y cols. 1993. Examination of human breast milk for evidence of human herpesvirus 6 by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 168: 250.

EDWARDS JA y cols. 2000. Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *J Neuroimmunol.* 108: 73-81.

EFSTATHIOU S y cols. 1988. DNA homology between a novel human herpesvirus (HHV-6) and human cytomegalovirus. *Lancet.* 1988: 63-64.

EFSTATHIOU S y cols. 1992. Identification of homologues to the human cytomegalovirus US22 gene family in human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 73: 1661-1671.

EIZURU Y y cols. 1989. Human herpesvirus 6 in lymph nodes. *Lancet.* i: 40-41.

ENBOM MC y cols. 1997. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand.* 95: 280-283.

ENDRES G y cols. 1990. Prevalence of antibodies to human herpesvirus 6 in different ages groups, children with exanthem subitum, other acute exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections in other herpesvirus and HIV. *Infection.* 18: 12-15.

ENSOLI B y cols. 1989. Human herpesvirus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *EMBO J.* 8: 3019-3027.

ESPOSITO M y cols. 1999. Human transaldolase and cross-reactive viral epitopes identified by autoantibodies of multiple sclerosis patients. *J Immunol.* 163: 4027-4032.

ESSERS S y cols. 1991. Seroepidemiological correlation of antibodies to human herpesviruses and human immunodeficiency virus type 1 in African patients. *Eur J Epidemiol.* 7: 658-664.

FAIRFAX MR y cols. 1994. Human herpesvirus 6 DNA in blood cells of human immunodeficiency virus-infected men: correlation of high levels with high CD4 cell counts. *J Infect Dis.* 169: 1342-1345.

FANTRY LE y CLEGHORN FR. 1999. HHV-6 infection in patients with HIV-1 infection and disease. *The AIDS Reader.* 9: 198-203, 221.

FARR TJ y cols. 1990. The distribution of antibodies to HHV-6 compared with other herpesvirus in young children. *Epidemiology.* 105: 603-607.

FEORINO P. 1988. Personal communication.

FERNÁNDEZ O y FERNÁNDEZ VE. 1997. Esclerosis Múltiple: una enfermedad relativamente frecuente en España. *Fundación Española de Esclerosis Múltiple.* 35-37.

FERNÁNDEZ O. 2000. Factores genéticos y medioambientales en esclerosis múltiple. *Rev Neurol.* 30: 964-967.

FERRANTE P y cols. 2000. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol.* 6: S109-114.

FERSZT R y cols. 1999. Amantadine revisited: an open trial of amantadinesulfate treatment in chronically depressed patients with Borna disease virus infection. *Pharmacopsychiatry.* 32: 142-147.

FILLET AM y cols. 1995. Controlled study of human herpesvirus 6 detection in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin lymphoma. The French Study Group for HIV-Associated Tumors. *J Med Virol.* 45: 106-112.

FILLET AM y cols. 1996. Detection of human herpesvirus 6 in AIDS-associated retinitis by means of in situ hybridisation, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol.* 49: 389-395.

FILLET AM y cols. 1998. HHV-6 and multiple sclerosis. *Nat Med.* 4: 537-538.

FLAMAND L y cols. 1991. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol.* 65: 5105-5110.

FLAMAND L y cols. 1993. Activation of the Epstein-Barr virus replicative cycle by human herpesvirus 6. *J Virol.* 67: 6768-6777.

FLAMAND L y cols. 1995. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood.* 85: 1263-1271.

FLAMAND L y cols. 1996. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest.* 97: 1373-1381.

FLAMAND L y MENEZES J. 1996. Cyclic AMP-responsive element-dependent activation of Epstein-Barr virus zebra promoter by human herpesvirus 6. *J Virol* 70: 1784-1791.

FOÀ-TOMASI L y cols. 1994. Polyvalent and monoclonal antibodies identify major immunogenic proteins specific for human herpesvirus 7-infected cells and weak cross-reactivity with human herpesvirus 6. *J Gen virol.* 75: 2719-2727.

FOÀ-TOMASI L y cols. 1995. Selection of monoclonal antibody specific for variant B human herpesvirus 6-infected mononuclear cells. *J Virol Methods.* 51: 289-296.

FOUCAR E y cols. 1990. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease): review of the entity. *Semin Diagn Pathol.* 7: 19-73.

FOX JD y cols. 1990. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet.* 336: 590-593.

FOX RI y cols. 1993. Detection of high levels of human herpesvirus 6-DNA in a lymphoma of a patient with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 20: 764-765.

FRANCIS GS y cols. 1996. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system, p. 1308-1343. En W.G. Bradley y cols. (ed.), *Neurology in clinical practice.* Butterworth-Heinemann, Boston, Mass.

FRENKEL N y cols. 1990_a. T-cell activation is required for efficient replication of human herpesvirus 6. *J Virol.* 64: 4598-4602.

FRENKEL N y cols. 1990_b. Isolation of a new herpesvirus from CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 748-752.

FRENKEL N y cols. 1994. Bone marrow transplant recipients harbour the variant B of human herpesvirus 6. *Bone Marrow Transplant.* 14: 839-843.

FRIEDMAN JE y cols. 1999. The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Mult Scler.* 5: 355-362.

FRIES BC y cols. 1994. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.* 169: 769-774.

FUJITA H y cols. 1996. Human herpesvirus 6-associated exanthema in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 92: 947-949.

FUKUDA K y cols. (INTERNATIONAL CHRONIC FATIGUE SYNDROME STUDY GROUP). 1994. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *An Intern Med.* 121: 953-959.

FURLINI G y cols. 1996. Concurrent human herpesvirus-6 infection renders two human hematopoietic progenitor (TF-1 and KG-1) cell lines susceptible to human immunodeficiency virus type-1. *Blood.* 87: 4737-4745.

FURUKAWA MM y cols. 1994. Distinct effects of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 on surface molecule expression and function of CD4+ cells. *J Immunol.* 152: 5768-5775.

GAO SJ y cols. 1996_a. KSHV antibodies among Americans, Italians, and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med.* 2: 925-928.

GAO SJ y cols. 1996_b. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 335: 233-241.

GARZINO-DEMO A y cols. 1996. Enhancement of TAT-induced transactivation of the HIV-1 LTR by two genomic fragments of HHV-6. *J Med Virol.* 50: 20-24.

GAUTHERET A y cols. 1995. Rate of detection of human herpesvirus 6 at different stages of HIV infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14: 820-824.

GENDELMAN HE y cols. 1986. Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 9759-9763.

GENG YQ y cols. 1992. Identification and characterisation of human herpesvirus 6 gene segment that trans-activates the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol* 66: 1564-1570.

GLEAVES CA y cols. 1985. Comparison of standard tube and shell vial culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 21: 217-221.

GOEDHARD JG y cols. 1995. Active human herpesvirus 6 infection in a adolescent male. *Clin Infect Dis.* 20: 1070-1071.

GOLD D y cols. 1990. Chronic fatigue. A prospective clinical and virologic study. *JAMA.* 264: 48-53.

GOLDBERG SH y cols. 1999. Polymerase chain reaction analysis of human herpesvirus-6 sequences in the sera and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 5: 134-139.

GOMPELS UA y cols. 1992. Infectivity determinants encoded in a conserved gene block of human herpesvirus-6 DNA. *Seq.* 3: 25-39.

GOMPELS UA y cols. 1993. Two groups of human herpesvirus 6 identified by sequence analyses of laboratory strains and variants from Hodgkin's lymphoma and bone marrow transplant patients. *J Gen Virol.* 74: 613-622.

GOMPELS UA y cols. 1995. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology.* 209: 29-51.

GOMPELS UA y MACAULAY HA. 1995. Characterisation of human telemeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol.* 76: 451-458.

GOPAL MR y cols. 1990. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. *Lancet.* 335: 1598-1599.

GUTIÉRREZ J y cols. 1998c. Microbiological diagnosis of nervous system infection by cytomegalovirus in AIDS patients: case study and review. *Microbios.* 95: 181-189.

GUTIÉRREZ J y cols. 1994. Evaluation of a new reagent for anti-cytomegalovirus and anti-Epstein-Barr virus IgG. *J Clin Microbiol.* 32: 2603.

GUTIÉRREZ J y cols. 1997a. A comparison of two ELISA methods for the investigation of anti-cytomegalovirus antibodies. *Microbios.* 90: 151-154.

GUTIÉRREZ J y cols. 1997b. Behaviour of IgG antibody avidity for the antigen and of IgA in active Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Herpes Simplex virus and Human Herpes virus-6 infections. *J Infect.* 35: 25-30.

GUTIÉRREZ J y cols. 1998a. Avidity test in the diagnosis of cytomegalovirus recent primary infection. *J Infect Dis.* 178: 599-560.

GUTIÉRREZ J y cols. 1998b. Correlación entre la presencia de anticuerpos y antígenos de citomegalovirus en los leucocitos de sangre periférica para el diagnóstico de la infección activa primaria. *Rev Med Chile.* 126: 533-537.

GUTIÉRREZ J y cols. 1999. Clinical reliability of IgG, IgA and IgM antibodies in detecting Epstein-Barr virus in different stages of infection with a commercial non-recombinant polyantigenic ELISA. *J Clin Lab Anal.* 13: 65-68.

GUTIÉRREZ J y MAROTO MC. 1992. Infección aguda por virus de Epstein-Barr. Estudio comparativo entre diversos métodos de diagnóstico. *Rev Clin Esp.* 191: 305.

GUTIÉRREZ J y MAROTO MC. 1997. Reliability of four methods for the diagnosis of acute infection by Epstein-Barr virus. *J Clin Lab An.* 11: 78-81.

- HAAHR S y cols. 1994. A putative new retrovirus associated with multiple sclerosis and the possible involvement of Epstein-Barr virus in the disease. *Ann NY Acad Sci.* 724: 148-156.
- HAAHR S y MUNCH M. 2000. The association between multiple sclerosis and infection with Epstein-Barr virus and retrovirus. *J Neurovirol.* 6: S76-79.
- HALL CB y cols. 1994. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med.* 331: 432-438.
- HALL CB y cols. 1998. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis.* 26: 132-137.
- HANUKOGLU A y SOMEKH E. 1994. Infectious mononucleosis-like illness in a infant with acute herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 13: 750-751.
- HARNETT GB y cols. 1990. Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. *J Med Virol.* 30: 128-130.
- HARNETT GB. 1996. Personal communication.
- HAY KA y TENSER RB. 2000. Leukotropic herpesviruses in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 6: 66-68.
- HE J y cols. 1996. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol.* 70: 1296-1300.
- HELLSTROM B y VAHLQUIST B. 1951. Experimental inoculation of roseola infantum. *Acta Paediatr.* 40: 189-197.
- HENGGE UR y cols. 1993. Foscarnet penetrates the blood-brain barrier: rationale for therapy of cytomegalovirus encephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1010-1014.
- HIDAKA Y y cols. 1994. Exanthem subitum and human herpesvirus 7 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 13: 1010-1011.
- HIGASHI K y cols. 1989. Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. *J Gen Virol.* 70: 3171-3176.
- HIRAI K y WATANBE Y. 1976. Induction of α -type DNA polymerase in human cytomegalovirus-infected WI-38 cells. *Biochem Biophys Acta.* 447: 328-339.
- HISAHARA S y cols. 2000. Targeted expression of baculovirus p35 caspase inhibitor in oligodendrocytes protects mice against autoimmune-mediated demyelination. *EMBO J.* 19: 341-348.
- HOLZ A y cols. 2000. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. *J Immunol.* 164: 1103-1109.
- HOLLINGSWORTH HC y cols. 1994. An investigation of the viral pathogenesis of Kikuchi-Fujimoto disease. Lack of evidence for Epstein-Barr virus or human herpesvirus type 6 as the causative agents. *Arch Pathol Lab Med.* 118: 134-140.

HORVAT RT y cols. 1989. Transactivation of human immunodeficiency virus promoter by human herpesvirus 6. *J Virol.* 63: 970-973.

HORVAT RT y cols. 1991. Transactivation of human immunodeficiency virus promoter by human herpesvirus 6 (HHV-6) strains GS and Z-29 in primary human T lymphocytes and identification of transactivating HHV-6(GS) gene fragments. *J Virol.* 65: 2895-2902.

HORVAT RT y cols. 1993. Human herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis.* 167: 1274-1280.

HOSHINO K y cols. 1995. Human herpesvirus 6-infection in renal allografts: retrospective immunohistochemical study in Japanese recipients. *Transplant Int.* 8: 169-173.

HUANG LM y cols. 1990. Human herpesvirus-6 associated with fatal haemophagocytic syndrome. *Lancet.* 336: 60-61.

HUANG LM y cols. 1991. Roseola infantum caused by human herpesvirus-6: report of 7 cases with emphasis on complications. *Taiwan I-Hsueh-Hui Tsa-Chih.* 90: 579-582.

HUANG LM y cols. 1992_a. Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma. *J Med Virol.* 38: 7-10.

HUANG LM y cols. 1992_b. Primary human herpesvirus 6 infections in children: a prospective serologic study. *J Infect Dis.* 165: 1163-1164.

HUANG YQ y cols. 1995. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 345: 759-761.

HUNTER SF y HAFLER DA. 2000. Ubiquitous pathogens: links between infection and autoimmunity in MS? *Neurology.* 55: 164-165.

IM DS y MUZYCZKA N. 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell.* 61: 447-457.

INOUE A y cols. 1999. Effect of anti-B7-1 and anti-B7-2 mAb on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Immunol.* 163: 6180-6186.

INOUE N y cols. 1994. Alphaherpesvirus origin-binding protein homologue encoded by human herpesvirus 6B, a betaherpesvirus, binds to nucleotide sequences that are similar to ori regions of alphaherpesvirus. *J Virol.* 68: 4126-4136.

INOUE N y PELLETT PR. 1995. Human herpesvirus 6B origin-binding protein: DNA-binding domain and consensus binding sequence. *J Virol.* 69: 4619-4627.

IRVING WL y cols. 1990_a. Dual antibodies rising to cytomegalovirus and human herpesvirus type 6: frequency of occurrence in CMV infections and evidence for genuine reactivity for both viruses. *J Infect Dis.* 161: 910-916.

IRVING WL y cols. 1990_b. Roseola infantum and other syndromes associated with acute HHV6 infection. *Arch Dis Child.* 65: 1297-1300.

- IRVING WL y CUNNINGHAM AL. 1990. Serological diagnosis of infection with human herpesvirus type 6. *Br Med J*. 300: 156-159.
- ISEGAWA Y y cols. 1998. Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *J Virol*. 72: 6104-6112.
- ISHIGURO N y cols. 1990. Meningo-encephalitis associated with HHV-6 related exanthem subitum. *Acta Paediatr Scand*. 79: 987-989.
- IULIANO R y cols. 1997. Human herpesvirus-6 reactivation in a longitudinal study of two HIV-1 infected patients. *J Med Virol*. 51: 259-264.
- IYENGAR S y cols 1991. Sero-epidemiological investigations on human herpesvirus 6 (HHV-6) infections using a newly developed early antigen assay. *Int J Cancer*. 49: 551-557.
- IZQUIERDO G y cols. 1990. Secreción intratecal de anticuerpos antivíricos en pacientes con esclerosis múltiple en Sevilla. *Neurología*. 5: 151-154.
- JACOBS U y cols. 1994. Severe allograft dysfunction after OKT3-induced human herpesvirus-6 reactivation. *Transplant Proc*. 26: 3121.
- JARRETT RF y cols. 1988. Identification of human herpesvirus 6-specific DNA sequences in two patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2: 496-502.
- JARRETT RF y cols. 1989. Variation in restriction map of HHV-6 genome. *Lancet*. i: 448-449.
- JARRETT RF y cols. 1990. Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva. *J Med Virol*. 32: 73-76.
- JAYAVASU C y cols. 1997. The latency of human herpesvirus 6 (HV6) in positive and negative human immunodeficiency virus (HIV) infection of intravenous drugs users (IVDU). *Asian Pac J Allergy Immunol*. 15: 29-33.
- JOHNSON RT. 1994. The virology of demyelinating diseases. *Ann Neurol*. 36: S54-S60.
- JONES CM y cols. 1994. Acute encephalopathy and status epilepticus associated with human herpesvirus 6 infection. *Dev Med Child Neurol*. 36: 646-650.
- JOSEPHS SF y cols. 1986. Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science*. 234: 601-603.
- JOSEPHS SF y cols. 1988_a. Detection of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus 6) sequences in B cell lymphoma tissues of three patients. *Leukemia*. 2: 132-135.
- JOSEPHS SF y cols. 1988_b. Molecular studies of HHV-6. *J Virol Methods*. 21: 179-180.
- KADAKIA MP y cols. 1996. Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogenic bone marrow transplantation. *Blood*. 87: 5341-5354.
- KANEGANE C y cols. 1995. Mononucleosis-like illness in an infant associated with human herpesvirus 6 infection. *Acta Paediatr Jpn*. 37: 227-229.

KASHANCHI F y cols. 1994. Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 protein expressed from the Sall-L fragment of human herpesvirus 6. *Virology*. 201: 95-106.

KASHANCHI F y cols. 1997. Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene*. 14: 359-367.

KASOLO FC y cols. 1997. Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa. *J Gen Virol*. 78: 847-855.

KATSAFANAS GC y cols. 1996. In vitro activation of human herpesvirus 6 and 7 from latency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 9788-9792.

KEDES DH y cols. 1996. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat Med*. 2: 918-924.

KELLEY PK y MCCLAIN KL. 1994. Respiratory contamination of polymerase chain reactions by human herpesvirus 6. *Am J Haematol*. 47: 325-327.

KEMPE CH y cols. 1950. Studies on the etiology of exanthem subitum (roseola infantum). *J Pediatr*. 37: 561-568.

KEMPF W y cols. 1994. Detection of human herpesvirus type 6, human herpesvirus type 7, cytomegalovirus and human papillomavirus in cutaneous AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 78: 260-264.

KEMPF W y cols. 1995. Human herpesvirus type 6 and cytomegalovirus in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: no evidence for an etiological association. *Hum Pathol*. 26: 914-919.

KEMPF W y cols. 1997. CD68+ cells of monocyte/macrophage lineage in the environment of AIDS-associated and classic-sporadic Kaposi sarcoma are singly or doubly infected with human herpesviruses 7 and 6B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 7600-7605.

KEMPF W y cols. 1998. Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen. *J Infect Dis*. 178: 841-845.

KENNEY S y cols. 1988. An Epstein-Barr virus immediate-early gene product trans-activates gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 1652-1656.

KIDO S y cols. 1990. Detection of human herpesvirus 6 DNA in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 32: 139-142.

KIEFF E. 1996. Epstein-Barr virus and its replication, p. 2343-2396. En: Fields B.N. et al. (ed.), *Fields virology*, 3^a ed., vol. 2. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

KIKUTA H y cols. 1989_a. Polymorphism of human herpesvirus 6 DNA from five Japanese patients with exanthem subitum. *J Infect Dis*. 160: 550-551.

KIKUTA H y cols. 1989_b. Susceptibility of human herpesvirus 6 to acyclovir. *Lancet*. ii: 861.

KIKUTA H y cols. 1990. Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J Infect Dis*. 162: 35-38.

KILLINGTON RA y cols. 1977. Comparative analysis of the proteins and antigens of five herpesvirus. *J Gen Virol*. 37: 297-310.

KIM JS y cols. 2000. Detection of human herpesvirus 6 variant A in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Eur Neurol*. 43: 170-173.

KIMBERLIN DW y cols. 1996. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. *J Infect Dis*. 174: 1162-1167.

KIRSCHNER DA y BLAUROCK E. 1992. Organisation, phylogenetic variations, and dynamic transitions of myelin. P.3-78. En: R.E. Martenson (ed.). Myelin: biology and chemistry. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

KISHI M y cols. 1988. A repeat sequence, GGTTA, is shared by DNA herpesvirus 6 and Marek's disease virus. *J Virol*. 62: 4824-4827.

KITAMURA K y cols. 1994. Idiopathic thrombocytopenic purpura after human herpesvirus 6 infection. *Lancet*. 344: 830.

KIVISAKK P y cols. 2000. Neutralising and binding anti-interferon-beta (IFN-beta) antibodies. A comparison between IFN-beta-1a and IFN-beta-1b treatment in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 7: 27-34.

KLOTMAN ME y cols. 1993. Detection of human herpesvirus 6 (HHV-6) and human herpesvirus 7 (HHV-7) in polymerase chain reaction (PCR) amplification. p.501-510. En: D.H. Persing (ed.), Diagnostic molecular microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

KNOWLES WA y GARDNER SD. 1988. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and seroconversion associated with rash in two infants. *Lancet*. ii: 912-913.

KNOX KK y CARRIGAN DR. 1992. In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis*. 165: 925-929.

KNOX KK y CARRIGAN DR. 1995. Active human herpesvirus (HHV-6) infection of the central nervous system in patients with AIDS. *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retroviruses*. 9: 69-73.

KNOX KK y CARRIGAN DR. 1996. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retroviruses*. 11: 370-378.

KNOX KK y cols. 1995_a. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in human immunodeficiency virus-infected infant. *J Med Virol*. 45: 288-292.

KNOX KK y cols. 1995_b. Progressive immunodeficiency and fatal pneumonitis associated with human herpesvirus 6 infection in a infant. *Clin Infect Dis*. 20: 406-413.

KOH C y cols. 2000. High-dose mouse immunoglobulin G administration suppresses Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol*. 108: 22-28.

KONDO K y cols. 1990. Detection by polymerase chain reaction amplification of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood of patients with exanthem subitum. *J Clin Microbiol*. 28: 970-974.

KONDO K y cols. 1991. Latent herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*. 72: 1401-1408.

KONDO K y cols. 1993. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis*. 167: 1197-1200.

KRUEGER GR y cols. 1990. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet*. 336: 1255-1256.

KRUEGER GR y cols. 1991_a. Clinical indications and diagnostic techniques of human herpesvirus-6 (HHV-6) infection. *In Vivo*. 5: 287-295.

KRUEGER GR y cols. 1991_b. Isolation of human herpesvirus-6 (HHV-6) from patients with collagen vascular diseases. *In Vivo*. 5: 217-225.

KRUEGER GR y cols. 1994. Human herpesvirus-6 (HHV-6) in Hodgkin's disease: cellular expression of viral antigens as compared to oncogenes met and fes, tumor suppresser gene product p53, and interleukins 2 and 6. *In Vivo*. 8: 501-516.

KURATA T y cols. 1990. Viral pathology of human herpesvirus 6 infection. *Adv Exp Med Biol*. 278: 39-47.

KUSUHARA K y cols. 1991. Do second attacks of exanthema subitum result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection?. *Pediatr Infect Dis J*. 10: 468-470.

KUSUHARA K y cols. 1992. Attack rate of exanthem subitum in Japan. *Lancet*. 340: 482.

LANNETTE ET y cols. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet*. 348: 858-861.

LASSMANN H y cols. 1998. Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunol*. 86: 213-217.

LAVI E y cols. 1999. Nidovirus infections: experimental model systems of human neurologic diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58: 1197-1206.

LAWRENCE GL y cols. 1990. Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol*. 64: 287-299.

LAWRENCE GL y cols. 1995. Human herpesvirus 6 (strain U1102) encodes homologues of the conserved herpesvirus glycoprotein gM and the alphaherpesvirus origin-binding protein. *J Gen Virol.* 76: 147-152.

LEACH CT y cols. 1994. Human herpesvirus 6 infection of the female genital tract. *J Infect Dis.* 169: 1281-1283.

LEVINE PH y cols. 1992_a. Antibodies to human herpesvirus-6 and clinical course in patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* 51: 53-57.

LEVINE PH y cols. 1992_b. Antibodies to human herpesvirus-6 in patients with acute lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 6: 1229-1231.

LEVINE PH y cols. 1992_c. Clinical, epidemiologic, and virologic studies in four clusters of the chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med.* 152: 1611-1616.

LEVINE PH y cols. 1992_d. Detection of human herpesvirus 6 in tissues involved by sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease). *J Infect Dis.* 166: 291-295.

LEVINE PH y cols. 1992_e. Geographic ethnic differences in human herpesvirus-6 antibody patterns. *Microbiol Immunol.* 36: 169-172.

LEVY JA y cols. 1990_a. Characterisation of a new strain of HHV-6 (HHV-6SF) recovered from the saliva of an HIV-infected individual. *Virology.* 178: 113-121.

LEVY JA y cols. 1990_b. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. *Lancet.* 335: 1047-1050.

LEVY JA y cols. 1990_c. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *J Clin Microbiol.* 28: 2362-2364.

LIBLAU R y FONTAINE B. 1999. Environment, genetics and immunology in multiple sclerosis. *Rev Prat.* 49: 1853-1860.

LIN J-C y cols. 1994. A strategy for precision genotyping of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: application for studying Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoms.* 15: 389-397.

LINDQUESTER GJ y cols. 1996. Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the human herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome. *Arch Virol.* 141: 367-379.

LINDQUESTER GJ y cols. 1997_a. Comparison of a 20 kb region of human herpesvirus 6B with other human herpesvirus reveals conserved replication genes and adjacent divergent open reading frames. *Arch Virol.* 142: 193-204.

LINDQUESTER GJ y cols. 1997_b. Genetic content of a 20.9 kb segment of human herpesvirus 6B strain Z29 spanning the homologues of human herpesvirus 6A genes U40-57 and containing the origin of replication. *Arch Virol.* 142: 103-123.

LINDQUESTER GJ y PELLETT PE. 1991. Properties of human herpesvirus 6 strain Z29 genome: G + C content, length, and presence of variable-length directly repeated terminal sequence elements. *Virology.* 182: 102-110.

LINHARES MI y cols. 1991. Seroprevalence of human herpesvirus 6 infection in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. *Microbiol Immunol.* 35: 1023-1027.

LITTLER E y cols. 1990. Identification, cloning, and expression of the major capsid protein gene of human herpesvirus 6. *J Virol.* 64: 714-72.

LIU DX y cols. 1993. Identification and expression of the human herpesvirus 6 glycoprotein H and interaction with an accessory 40K glycoprotein. *J Gen Virol.* 74: 1847-1857.

LÓPEZ C y cols. 1988. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis.* 157: 1271-1273.

LOZANO F y cols. 1991. Infección por el herpesvirus humano tipo 6: epidemiología, inmunopatología e implicaciones clínicas. *Rev Clin Esp.* 190: 37.

LUCCHINETTI C y cols. 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 47: 707-717.

LUKA J y cols. 1990. Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *J Clin Lab Anal.* 4: 483-486.

LUKA J y cols. 1991. HHV-6 genome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 338: 1277-1278.

LUPPI M y cols. 1993_a. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol.* 40: 44-52.

LUPPI M y cols. 1993_b. Frequent detection of human herpesvirus 6 sequences by polymerase chain reaction in paraffin-embedded lymph nodes from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Leuk Res.* 17: 1003-1011.

LUPPI M y cols. 1994_a. Detection of human herpesvirus-6 sequences in normal human brains and in neurological tumors, abstr. A3518. En: Proceedings of the 35th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research.

LUPPI M y cols. 1994_b. Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *J Infect Dis.* 169: 943-944.

LUPPI M y cols. 1994_c. Integration of human herpesvirus-6 (HHV-6) genome in chromosome 17 in two lymphoma patients. *Leukemia.* 8: S41-S45.

LUPPI M y cols. 1995_a. Human herpesvirus-6 (HHV-6) in blood donors. *Br J Haematol.* 89: 943-945.

LUPPI M y cols. 1995_b. Human herpesvirus-6: a survey of presence and distribution of genomic sequences in normal brain and neuroglial tumors. *J Med Virol.* 47: 105-111.

LUPPI M y cols. 1996. Frequency and distribution of herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) in different stages of classic Kaposi's sarcoma and in normal tissues from an Italian population. *Int J Cancer.* 66: 427-431.

- LUPPI M y cols. 1998. Integration of human herpesvirus 6 genome in human chromosomes. *Lancet*. 352: 1707-1708.
- LUPPI M y cols. 1999. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J Virol*. 73: 754-759.
- LUSSO P y cols. 1988. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med*. 167: 1659-1670.
- LUSSO P y cols. 1989. Productive dual infection of human CD4+T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature*. 337: 370-373.
- LUSSO P y cols. 1990. In vitro susceptibility of T lymphocytes from chimpanzees (Pan troglodytes) to human herpesvirus 6 (HHV-6): a potential animal model to study the interaction between HHV-6 and human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol*. 64: 2751-2758.
- LUSSO P y cols. 1991_a. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature*. 349: 533-535.
- LUSSO P y cols. 1991_b. Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down regulation of CD3. *J Immunol*. 147: 685-691.
- LUSSO P y cols. 1993. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*. 362: 458-462.
- LUSSO P y cols. 1994. In vitro susceptibility of Macaca nemestrina to human herpesvirus 6: a potential animal model of coinfection with primate immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 10: 181-187.
- LUSSO P y cols. 1995. Infection of γ/δ T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *J Exp Med*. 181: 1303-1310.
- LUSSO P y GALLO RC. 1995. Human herpesvirus 6 in AIDS. *Immunol Today*. 16: 67-71.
- LYALL EGH y CUBIE HA. 1995. Human herpesvirus-6 DNA in the saliva of paediatric oncology patients and controls. *J Med Virol*. 47: 317-322.
- LYCKE J y cols. 1996. Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol*. 143: 214-224
- MACKENZIE IR y cols. 1995. Chronic myelopathy associated with human herpesvirus-6. *Neurology*. 45: 2015-2017.
- MARSH S y cols. 1996. Development and application of HHV-6 antigen capture assay for the detection of HHV-6B infections. *J Virol Methods*. 61: 103-112.
- MARSHALL GS y cols. 1991. Chronic fatigue in children: clinical features, Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6 serology and long term follow-up. *Pediatr Infect Dis J*. 10: 287-290.

MARTIN C y cols. 1997. Absence of seven human herpesviruses, including HHV-6, by polymerase chain reaction in CSF and blood from patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Acta Neurol Scand.* 95: 280-283.

MARTIN M y cols. 1991_a. Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol.* 65: 5381-5390.

MARTIN M y cols. 1991_b. The genome of human herpesvirus 6: maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol.* 72: 157-168.

MARTINO G y cols. 2000. Cytokine gene therapy of autoimmune demyelination revisited using herpes simplex virus type-1-derived vectors. *Gene Ther.* 7: 1087-1093.

MAWLE AC y cols. 1993. Is chronic fatigue syndrome an infectious disease?. *Infect Agent Dis.* 2: 333-341.

MAYNE M y cols. 1998. Infrequent detection of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 44: 391-394.

MCCULLERS JA y cols. 1995. Human herpesvirus 6 associated with focal encephalitis. *Clin Infect Dis.* 21: 571-576.

MCELHINNEY LM y cols. 1995. Multiplex polymerase chain reaction for human herpesvirus-6, human cytomegalovirus, and human beta-globin DNA. *J Virol Methods.* 53: 223-233.

MCGAVERN DB y cols. 1999. Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp Neurol.* 158: 171-181.

MCGAVERN DB y cols. 2000. Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain.* 123: 519-31.

MCGEOCH DJ y cols. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region of the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 69: 1531-1574.

MEGAW AG y cols. 1998. The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology.* 244: 119-132.

MEINL E. 1999. Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 12: 303-307.

MENDEL I y cols. 1995. Fulminant hepatitis in neonates with human herpesvirus 6 infection. *Pediatric Infect Dis J.* 14: 993-997.

MENOTTI L y cols. 1999. Trafficking to the plasma membrane of the seven-membrane protein encoded by human herpesvirus-6 U51 gene involves a cell-specific function present in T-lymphocytes. *J Virol.* 73: 325-333.

MERELLI E y cols. 1996. An encephalitic episode in a multiple sclerosis patient with human herpesvirus 6 latent infection. *J Neurol Sci.* 137: 42-46.

- MERELLI E y cols. 1997. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 8 DNA sequences in brains of multiple sclerosis patients, normal adults and children. *J Neurol.* 244: 450-454.
- MERLINO C y cols. 1992. Human herpesvirus-6 infection and renal transplantation. *Transplantation.* 53: 1382-1383.
- MEYNE J y cols. 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 7049-7053.
- MICHEL D y cols. 1994. Human herpesvirus 6 DNA in exanthematous skin in BMT patient. *Lancet.* 344: 686.
- MILNE RSB y cols. 1998. The human herpesvirus 6 U51-encoded chemokine receptor-like protein down regulates expression of the chemokine RANTES. 1998. En: Proceedings of the 23rd International Herpesvirus Workshop; York, UK.
- MIRANDOLA P y cols. 1998. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol.* 72: 3837-3844.
- MIRANDOLA P y cols. 1999. Absence of human herpesvirus 6 and 7 from spinal fluid and serum of multiple sclerosis patients. *Neurology.* 53: 1367-1368.
- MOLLER KL. 1956. Exanthema subitum and febrile convulsions. *Acta Paediatr.* 45: 534-540.
- MONTEYNE P y cols. 1998. Viruses and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 11: 287-291.
- MOORE PS y CHANG Y. 1995. Detection of herpes-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med.* 332: 1181-1185.
- MORI Y y cols. 1998. Analysis of human herpesvirus 6 U3 gene, which is a positional homologue of human cytomegalovirus UL24 gene. *Virology.* 249: 129-139.
- MORI Y y YAMANISHI K. 1998. human herpesvirus 6 and 7 infections. *Nippon Rinshi.* 56: 17-22.
- MOSCA JD y cols. 1987_a. Activation of human immunodeficiency virus by herpesvirus infection: identification of a region within the long terminal repeat that responds to a trans-acting factor encoded by herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci.* 84: 7408-7412.
- MOSCA JD y cols. 1987_b. Herpes simplex virus type-1 can reactivate transcription of latent human immunodeficiency virus. *Nature.* 325: 67-70.
- MUKAI T y cols. 1994. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol.* 42: 224-227.
- MUKAI T y cols. 1995. Identification of the major capsid protein gene of human herpesvirus 7. *Virus Res.* 37: 1-8.
- MUNCH M y cols. 1998. The significance of Epstein-Barr virus seropositivity in multiple sclerosis patients?. *Acta Neurol Scand.* 97: 171-174.

MURRAY PG y cols. 1992. Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol.* 166: 1-5.

MYHR KM y cols. 1998. Altered antibody pattern to Epstein-Barr virus but not other herpesviruses in multiple sclerosis: a population case-control study from western Norway. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 64: 539-542.

NABEL GJ y cols. 1988. Alternative mechanisms for activation of human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *Science.* 239: 1299-1302.

NEIPEL F y cols. 1992. Gene for the major antigenic structural protein (p100) of human herpesvirus 6. *J Virol.* 66: 3918-3924.

NICHOLAS J y MARTIN MED. 1994. Nucleotide sequence analysis of a 38.5-kilobase-pair region of the genome of the human herpesvirus 6 encoding human cytomegalovirus major immediate-early gene homologues and transactivation functions. *J Virol.* 68: 597-610.

NICHOLAS J. 1994. Nucleotide sequence analysis of 21-kbp region of the genome of human herpesvirus-6 containing homologues of human cytomegalovirus major immediate-early and replication genes. *Virology.* 204: 738-750.

NICHOLAS J. 1996. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus 7. *J Virol.* 70: 5975-5989.

NIEDERMAN JC y cols. 1988. Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet.* ii: 817-819.

NIELSEN L y cols. 1997. Human herpesvirus-6 immunoglobulin G antibodies in patients with multiple sclerosis. *Acta Neuro Scand Suppl.* 169: 76-78.

NIGRO G y cols. 1995. Detection of IgM antibodies to human herpesvirus 6 in Romanian children with nonprogressive human immunodeficiency virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 14: 891-894.

NII S y cols. 1990. Replication of human herpesvirus 6 (HHV-6): morphological aspects. *Adv Exp Med Biol.* 278: 19-28.

NJENGA MK y cols. 2000. Short-term treatment with interferon-alpha/beta promotes remyelination, whereas long-term treatment aggravates demyelination in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 59: 661-670.

OHARA Y. 1999. Multiple sclerosis and measles virus. *Jpn J Infect Dis.* 52: 198-200.

OKADA K y cols. 1993. Exanthema subitum and human herpesvirus 6 infection: clinical observations in fifty-seven cases. *Pediatr Infect Dis J.* 12: 204-208.

OKUNO T y cols. 1989. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol.* 27: 651-653.

OKUNO T y cols. 1990_a. Analysis of a glycoprotein for human herpesvirus 6 (HHV-6) using monoclonal antibodies. *Virology.* 176: 625-628.

- OKUNO T y cols. 1990_b. Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. *Transplantation*. 49: 519-522.
- OKUNO T y cols. 1991. Outbreak of exanthem subitum in a orphanage. *J Pediatr*. 119: 759-761.
- OKUNO T y cols. 1995. Human herpesvirus 6 and 7 in cervixes of pregnant women. *J Clin Microbiol*. 33: 1968-1970.
- ONGRADI J y cols. 1999. A pilot study on the antibodies to HHV-6 variants and HHV-7 in CSF of MS patients. *J Neurovirol*. 5: 529-532.
- OSIOWY C y cols. 1998. Detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by a microplate PCR-hybridisation assay. *J Clin Microbiol*. 36: 68-72.
- PARKER CA y WEBER JM. 1993. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J Virol Methods*. 41: 265-276.
- PARRIS DS y cols. 1988. Identification of a gene encoding the 65-kilodalton DNA-binding protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 62: 818-825.
- PATNAIK M y PATER JB. 1995. Intrathecal synthesis of antibodies to human herpesvirus 6 early antigen in patients with meningitis/encephalitis. *Clin Infect Dis*. 21: 715-716.
- PATNAIK MA y cols. 1995. Prevalence of IgM antibodies to human herpesvirus 6 early antigen (p41/38) in patients with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis*. 172: 1264-1267.
- PAVELKO KD y cols. 2000. HLA-DQ Polymorphism influences progression of demyelination and neurologic deficits in a viral model of multiple sclerosis. *Mol Cell Neurosci*. 15: 495-509.
- PELLET PE y cols. 1990. Genomic heterogeneity of human herpesvirus 6 isolates. *Adv Exp Med Biol*. 278: 9-18.
- PELLET PE y cols. 1993. A strongly immunoreactive virion protein of human herpesvirus 6 variant B strain Z29: identification and characterisation of the gene and mapping of a variant-specific monoclonal antibody reactive epitope. *Virology*. 195: 521-531.
- PERRON H y cols. 2000. Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis? *J Neurovirol*. 6: S67-S75.
- PFEIFFER B y cols. 1993. Identification and mapping of the gene encoding the glycoprotein complex gp82-gp105 of human herpesvirus 6 and mapping of the neutralising epitope recognised by monoclonal antibodies. *J Virol*. 67: 4611-4620.
- PFEIFFER B y cols. 1995. Identification and characterisation of cDNA derived from multiple splicing that encodes envelope glycoprotein gp105 of human herpesvirus 6. *J Virol*. 69: 3490-3500.

PIETROBONI GR y cols. 1988_a. Antibody to human herpesvirus 6 in saliva. *Lancet*. i: 1059.

PIETROBONI GR y cols. 1988_b. Human herpesvirus type 6 (HHV-6) and its in vitro effect on human immunodeficiency virus (HIV). *J Clin. Pathol.* 41: 1310-1312.

PINTER C y cols. 2000. Presence of autoantibodies against complement regulatory proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 6: S42-S46.

PITALIA AK y cols. 1993. Immunohistological detection of human herpesvirus 6 in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues. *J Med Virol.* 41: 103-107.

PORTOLANI M y cols. 1993. Human herpesvirus 6 infections in infants admitted to hospital. *J Med Virol.* 39: 146-151.

PREZIOSO PJ y cols. 1992. Fatal disseminated infection with human herpesvirus-6. *J Pediatr.* 120: 921-923.

PROU O y COUROUCË AM. 1989. Human B lymphotropic virus (HBLV) or human herpesvirus (HHV-6). *Rev Fr Transfus Hemobiol.* 32: 203-213.

PRUKSANANONDA P y cols. 1992 . Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med.* 326: 1445-1450.

QAVI HB y cols. 1994. Possible role of HHV-6 in the development of AIDS retinitis. *In Vivo.* 8: 527-532.

QAVI HB y cols. 1995. HIV-1 and HHV-6 antigens and transcripts in retinas of patients with AIDS in the absence of human cytomegalovirus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36: 2040-2047.

RAGONA G y cols. 1995. Subclinical infection of the respiratory tract of immunocompromised patients by human herpesvirus-6. *Blood.* 85: 295-296.

RAND KH y cols. 2000. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) associated oligoclonal bands in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 173: 32-39.

RANGER S y cols. 1991. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol.* 34: 194-198.

RANGER-ROGEZ SE y cols. 1995. Large-scale study suggests no direct link between human herpesvirus-6 and primary Sjögren's syndrome. *J Med Virol.* 47: 198-203.

RAZZAQUE A y cols. 1993. Neoplastic transformation of immortalised human epidermal keratinocytes by two HHV-6 DNA clones. *Virology.* 195: 113-120.

RAZZAQUE A. 1990. Oncogenic potential of human herpesvirus-6 DNA. *Oncogene* 5: 1365-1370.

READ R y cols. 1990. Clinical and laboratory findings in the Paul-Bunnell negative glandular fever-fatigue syndrome. *J Infect.* 21: 157-165.

RICE GPA. 1992. Virus-induced demyelination in man: models for multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 5: 188-194.

RIEGER F y cols. 2000. New perspectives in multiple sclerosis: retroviral involvement and glial cell death. *Pathol Biol (Paris)*. 48: 15-24.

ROBERT C y cols. 1990. Detection of antibodies of human herpesvirus-6 using immunofluorescence assay. *Res Virol*. 141: 545-555.

ROBERT C y cols. 1994. Human herpesvirus-6 infection and hepatitis following heart transplantation. *Presse Med*. 23: 1209-1210.

ROFFMAN E y cols. 1990. Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *J Virol*. 64: 6308-6313.

ROIZMAN B y cols. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol*. 123: 425-449.

ROIZMAN B y SEARS AE. 1996. Herpes simplex virus and their replication, p2231-2295. En: B.N Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.), *Field virology* 3rd ed., vol. 2 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

ROLDÁN C y cols. 1993. Seroprevalencia de la infección por herpesvirus humano tipo 6 en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc.)*. 101: 637-638.

ROLDÁN C y cols. 1995_b. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults in Spain. *Serodiagn Immunother Infect Dis*. 7: 150-160.

ROLDÁN C y cols. 1996. Low prevalence of circulating anti-type 6 human herpes virus IgG-antibodies in Spanish children. *Microbios*. 86: 233-236.

ROSAI J y DORFMAN RF. 1969. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A newly recognised benign clinopathological entity. *Arch Pathol Lab Med*. 87: 63-70.

ROSAI J y DORFMAN RF. 1972. Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: a pseudolymphomatous disorder. Analysis of 34 cases. *Cancer*. 30: 1174-1788.

ROSENFELD CS y cols. 1995. Late graft failure due to dual bone marrow infection with variants A ad B of human herpesvirus-6. *Exp Hematol*. 23: 626-629.

ROSS RT y cols. 1995. Varicella zoster virus and multiple sclerosis in a Hutterite population. *J Clin Epidemiol*. 48: 1319-1324.

ROTOLA A y cols. 1998. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad USA*. 95: 13911-13916.

ROTOLA A y cols. 1999. Human herpesvirus 6 is latent in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 67: 529-531.

ROTOLA A y cols. 2000. Novel human herpesviruses and multiple sclerosis. *J Neurovirol*. 6: S88-S91.

RUSSLER SK y cols. 1989. Susceptibility of human herpesvirus 6 to acyclovir and ganciclovir. *Lancet*. ii: 382.

RUSSLER SK y cols. 1991. Pneumonitis associated with coinfection by human herpesvirus 6 and Legionella in an immunocompetent adult. *Am J Pathol*. 138: 1405-1411.

RUVOLO VR y cols. 1996. Cloning, restriction endonuclease mapping and partial sequence analysis of the genome of human herpesvirus 7 strain JI. *J Gen Virol*. 77: 1901-1912.

SADA E y cols. 1996. 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.

SAIJO M y cols. 1995_a. Thrombocytopenic purpura associated with primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J*. 14: 405.

SAIJO M y cols. 1995_b. Thrombocytopenic purpura associated with primary human herpesvirus-6 infection. *J Jpn Assoc Infect Dis*. 69: 316-319.

SAIRENJI T y cols. 1995. Antibody responses to Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 in patients with chronic fatigue syndrome. *Intervirology*. 38: 269-273.

SAITO Y y cols. 1995. Cellular localisation of human herpesvirus-6 in the brains of children with AIDS encephalopathy. *J Neurovirol*. 1: 30-39.

SALAHUDDIN SZ y cols. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 234: 596-601.

SALAHUDDIN SZ. 1992. The discovery of human herpesvirus type 6. P. 3-8. En: D.V. Ablashi, G.R.F. Krueger, and S.Z. Salahuddin (ed.), Human herpesvirus 6: epidemiology, molecular biology, and clinical pathology, vol. 4. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

SANDERS VJ y cols. 1996. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol*. 2: 249-258.

SANTORO F y cols. 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*. 99: 817-827.

SATHORNSUMETEE S y cols. 2000. Quantitative ultrastructural analysis of a single spinal cord demyelinated lesion predicts total lesion load, axonal loss, and neurological dysfunction in a murine model of multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 157: 1365-1376.

SAXINGER C y cols. 1988. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations. *J Virol Methods*. 21: 199-208.

SCHIEWE U y cols. 1994. Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus 6 genome. *J Virol.* 68: 2978-2985.

SCHIRMER EC y cols. 1991. Differentiation between two distinct classes of virus now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 5922-5926.

SECCHIERO P y cols. 1995_a. 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.

SECCHIERO P y cols. 1995_b. Identification of human telomeric repeat motifs at the genome termini of human herpesvirus 7: structural analysis and heterogeneity. *J Virol.* 69: 8041-8045.

SECCHIERO P y cols. 1995_c. Quantitative PCR for human herpesvirus 6 and 7. *J Clin Microbiol.* 33: 2124-2130.

SEGONDY M y cols. 1992. Herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med.* 327: 1099-1100.

SEINMAN L. 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell.* 85: 299-302.

SHIRAKI K y cols. 1989. Virion and nonstructural polypeptides of human herpesvirus 6. *Virus Res.* 12: 311-318.

SI I-J y cols. Herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma from AIDS and non-AIDS patients in Taiwan. *Lancet.* 435: 722-723.

SIECZKOWSKY L y cols. 1995. The human immunodeficiency virus tat gene enhances replication of human herpesvirus-6. *Virology.* 211: 544-553.

SIMON J y NEUBERT J. 1996. The pathogenesis of multiple sclerosis: reconsideration of the role of viral agents and defence mechanisms. *Med Hypoth.* 46: 537-543.

SINGH N y cols. 1995. Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. *Transplantation.* 60: 1355-1357.

SOBUE R y cols. 1991. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. *N Engl J Med.* 324: 1290.

SOLA P y cols. 1993. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psych.* 65: 917-919.

SOLDAN SS y cols. 1997. Association of human herpesvirus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med.* 3: 1394-1397.

SOLDAN SS y cols. 2000. Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 47: 306-313.

SPIRA TJ y cols. 1990. Lack of correlation between human herpesvirus-6 infection and the course of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 161: 567-570.

STAMEY FR y cols. 1995. Intragenomic linear amplification of human herpesvirus 6B oriLyt suggest acquisition of oriLyt by transposition. *J Virol.* 69: 586-596.

STAMMERS TG. 1988. Roseola infantum: the neglected exanthem. *Practitioner.* 232: 541-544.

STASIAK PC y cols. 1992. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol.* 66: 1050-1058.

STEEPER TA y cols. 1990. The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am J Clin Pathol.* 93: 776-783.

STOHLMAN SA y HINTON DR. 2001. Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 11: 92-106.

STOW ND y cols. 1990. Analysis of the binding sites for the varicella-zoster virus gene 51 product within the viral origin of DNA replication. *Virology.* 177: 570-577.

STREICHER HZ y cols. 1988. In vitro inhibition of human herpesvirus-6 by phosphonoformate. *J Virol Methods.* 21: 301-304.

SUGA S y cols. 1989. Human herpesvirus-6 infection (exanthema subitum) without rash. *Pediatrics.* 83: 1003-1006.

SUGA S y cols. 1990_a. Neutralising antibody assay for human herpesvirus-6. *J Med Virol.* 30: 14-19.

SUGA S y cols. 1990_b. Simultaneous infection with human herpesvirus-6 and measles virus in infants. *J Med Virol.* 31: 306-311.

SUGA S y cols. 1992. IgM neutralising antibody responses to human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum or organ transplantation. *Microbiol Immunol.* 36: 495-506.

SUGA S y cols. 1993. Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthema subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol.* 33: 597-603.

SUGA S y cols. 1995. Detection of human herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. *J Med Virol.* 46: 52-55.

SUGITA K y cols. 1995. Human herpesvirus 6 infection associated with hemophagocytic syndrome. *Acta Haematol.* 93: 108-109.

SUMIYOSHI Y y cols. 1993. Human herpesvirus-6 genomes in histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease) and other forms of lymphadenitis. *Am J Clin Pathol.* 99: 609-614.

SUMIYOSHI Y y cols. 1994. Detection of human herpesvirus 6 (HHV-6) in the skin of a patient with primary HHV-6 infection and erythroderma. *J Clin Pathol.* 47: 762-763.

TAIT DR y cols. 1996. Measles and rubella misdiagnosed in infants as exanthema subitum (roseola infantum). *Br Med J.* 312: 101-102.

TAJIRI H y cols. 1990. Human herpesvirus-6 infection with liver injury in neonatal hepatitis. *Lancet.* 335: 863.

TAKAHASHI K y cols. 1988. Human herpesvirus 6 and exanthem subitum. *Lancet.* i: 463.

TAKAHASHI K y cols. 1989. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol.* 63: 3161-3163.

TAKAHASHI K y cols. 1992. Interferon and natural killer cell activity in patients with exanthem subitum. *Pediatr Infect Dis J.* 11: 369-373.

TAKASAKI T y cols. 1997. Electronmicroscopic study of human herpesvirus 6-infected human T cell lines superinfected with human immunodeficiency virus type 1. *Acta Virol.* 41: 221-229.

TAKEDA K y cols. 1996. Identification of a variant A-specific neutralising epitope on glycoprotein B (gB) of human herpesvirus-6 (HHV-6). *Virology.* 222: 176-183.

TAKIKAWA T y cols. 1992. Liver dysfunction, anaemia, and granulocytopenia after exanthema subitum. *Lancet.* 340: 1288-1289.

TANAKA K y cols. 1994. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr.* 125: 1-5.

TANAKA-TAYA K y cols. 1996. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 48: 88-94.

TAUS C y cols. 2000. Absence of HHV-6 and HHV-7 in cerebrospinal fluid in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 101: 224-228.

TEDDER RS y cols. 1987. A novel lymphotropic virus. *Lancet.* ii: 390-392.

TENORIO A y cols. 1993. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Meth.* 44: 261-269.

TEO IA y cols. 1991. Characterisation of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6. *J Virol.* 65: 4670-4680.

THOMPSON J y cols. 1994. A transforming fragment within the direct repeat region of human herpesvirus type 6 that transactivates HIV-1. *Oncogene* 9: 1167-1175.

- THOMPSON JR y cols. 1994. A novel cis element essential for stimulated transcription of the p41 promoter of human herpesvirus 6. *J Virol.* 68: 4478-4485.
- THOMSON B y cols. 1994. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol.* 68: 3007-3014.
- THOMSON BJ y cols. 1991_a. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature.* 351: 78-80.
- THOMSON BJ y cols. 1991_b. The molecular and cellular biology of human herpesvirus-6. *Rev Med Virol.* 1: 89-99.
- THOMSON BJ y cols. 1994. Human herpesvirus (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 *rep* gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology.* 204: 304-311.
- TORELLI G y cols. 1991. Human herpesvirus-6 human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood.* 77: 2251-2258.
- TORELLI G y cols. 1995. Targeted integration of human herpesvirus 6 in p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol.* 46: 178-188.
- TORIGOE S y cols. 1995. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child.* 72: 518-519.
- TRABATTONI D y cols. 2000. Augmented type 1 cytokines and human endogenous retroviruses specific immune responses in patients with acute multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 6: S38-S41.
- UEDA K y cols. 1989. Exanthem subitum and antibody to human herpesvirus-6. *J Infect Dis.* 159: 750-752.
- UEDA K y cols. 1994. Primary human herpesvirus 7 infection and exanthem subitum. *Pediatr Infect Dis J.* 13: 167-168.
- VAN LOON NM y cols. 1995. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison with HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis.* 21: 1017-1019.
- VAN ZEJIL JH y cols. 1995. Human herpesvirus 6 mononucleosis and seizures. *Pediatr Infect Dis J.* 14: 637.
- VON HERRATH MG. 2000. Obstacles to identifying viruses that cause autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 107: 154-160.
- WAKEFIELD D y cols. 1988. Human herpesvirus 6 and myalgic encephalomyelitis. *Lancet.* i: 1059.
- WANDINGER KP y cols. 2000. Epstein-Barr virus reactivation associated with MS disease activity. *Neurology.* 55: 178-184.

WANG F-Z y cols. 1996. Lymphotropic herpesvirus in allogenic bone marrow transplantation. *Blood*. 88: 3615-3620.

WARD KN y cols. 1989. Brief report: primary human herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor. *J Med Virol*. 28: 69-72.

WARD KN y cols. 1991. Primary and recurrent cytomegalovirus infections have different effects on human herpesvirus-6 antibodies in immunosuppressed organ graft recipients: absence of virus cross-reactivity and evidence for virus interaction. *J Med Virol*. 34: 258-267.

WARD KN y cols. 1993. IgG antibodies to human herpesvirus-6 distinguishes primary from recurrent infection in organ transplant recipients and excludes cross-reactivity with other herpesviruses. *J Med Virol*. 39: 44-49.

WARD KN y GRAY JJ. 1994. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol*. 42: 119-123.

WARRINGTON AE y cols. 2000. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6820-6825.

WELLER SK y cols. 1985. Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol*. 5: 930-942.

WIERSBITZKY S y cols. 1992. Complications of acute respiratory tract infection (pneumonia, sinusitis) in young children associated with acute HHV-6 infection. *Kinderaerztl Prax*. 60: 159-162.

WIERSBITZKY S y cols. 1993. Acute obstructive respiratory diseases (ARD) and bacterial complications of ARD (pneumonia, sinusitis) in infants and children associated with human herpesvirus-6 infection. *Paediatr Grenzgebiete*. 31: 195-197.

WILBORN y cols. 1994_a. Detection of herpesvirus type 6 by polymerase chain reaction in blood donors: random and prospective longitudinal studies. *Br J Haematol*. 88: 187-192.

WILBORN F y cols. 1994_b. A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *J Neuroimmunol*. 49: 213-214.

WILBORN F y cols. 1994_c. Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood*. 83: 3052-3058.

WILLIAMS MV. 1992. HHV-6: response to antiviral agents, p. 317-335. En: DV Ablashi, GRF. Krueger y SZ Salahuddin (ed.), Human herpesvirus-6: epidemiology, molecular biology, and clinical pathology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

WYATT LS y cols. 1990. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J Infect Dis*. 162: 852-857.

- WYATT LS y cols. 1991. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol.* 65: 6260-6265.
- WYATT LS y FRENKEL N. 1992. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol.* 66: 3206-3209.
- YADAV M y cols. 1991. Antibody reactivity with two strains of human herpesvirus-6 in Malaysians. *J Med Virol.* 33: 236-239.
- YADAV M y cols. 1994. Frequent detection of human herpesvirus 6 in oral carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 86: 1792-1794.
- YALCIN S y cols. 1992. Experimental infection of cynomolgus and African green monkeys with human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 73: 1673-1677.
- YALCIN S y cols. 1994_a. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol.* 136: 183-190.
- YALCIN S y cols. 1994_b. Prevalence of human herpesvirus 6 variants A and B in patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol Immunol.* 38: 587-590.
- YAMAMOTO M y cols. 1990. Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infection. *J Clin Microbiol.* 28: 1957-1962.
- YAMAMOTO T y cols. 1994. Variation of DNA sequence in immediate-early gene of human herpesvirus 6 and variant identification by PCR. *J Clin Microbiol.* 32: 473-476.
- YAMANISHI K y cols. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet.* i: 1065-1067.
- YAMANISHI K. 1992. Human herpesvirus 6. *Microbiol Immunol.* 36: 551-561.
- YANAGI K y cols. 1990. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and decrease in titer with increase in age in Japan. *J Infect Dis.* 161: 153-154.
- YANAGIHARA K y cols. 1995. Human herpesvirus 6 meningoencephalitis with sequelae. *Pediatr Infect Dis J.* 14: 240-241.
- YIN SY y cols. 1993. In situ hybridisation detection of human herpesvirus 6 in biopsy specimens from Chinese patients with non-Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 117: 502-506.
- YOSHIDA M y cols. 1989. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol.* 33: 147-154.
- YOSHIDA M y cols. 1995. Exanthema subitum (roseola infantum) with vesicular lesions. *Br J Dermatol.* 132: 614-616.
- YOSHIGAWA T y cols. 1989. Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpesvirus-6) in healthy individuals. *Pediatrics.* 84: 675-677.

YOSHIKAWA T y cols. 1990. Neutralising antibodies to human herpesvirus-6 in healthy individuals. *Pediatr. Infect. Dis J.* 9: 589-590.

YOSHIKAWA T y cols. 1991. Human herpesvirus-6 infection in bone marrow transplantation. *Blood.* 78: 1381-1384.

YOSHIKAWA T y cols. 1992_a. A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. *Transplantation.* 54: 879-883.

YOSHIKAWA T y cols. 1992_b. Endonucleases analysis of DNA of human herpesvirus-6 isolated from blood before and after bone marrow transplantation. *J Med Virol.* 37: 228-231.

YOSHIKAWA T y cols. 1992_c. Human herpesvirus-6 DNA in cerebrospinal fluid of a child with exanthema subitum and meningoencephalitis. *Pediatrics.* 89: 888-890.

YOSHIKAWA T y cols. 1993. Exacerbation of idiopathic thrombocytopenic purpura by primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 12: 409-410.

YOSHIYAMA H y cols. 1990. Role of human herpesvirus 6 infection in infants with exanthema subitum. *Pediatr Infect Dis J.* 9: 71-74.

ZHOU Y y cols. 1994. Trans-activation of the HIV promoter by cDNA and its genomic clones of human herpesvirus-6. *Virology.* 199: 321-322.

ZUR HAUSEN H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of ano-genital cancer. *Virology.* 184: 9-13.