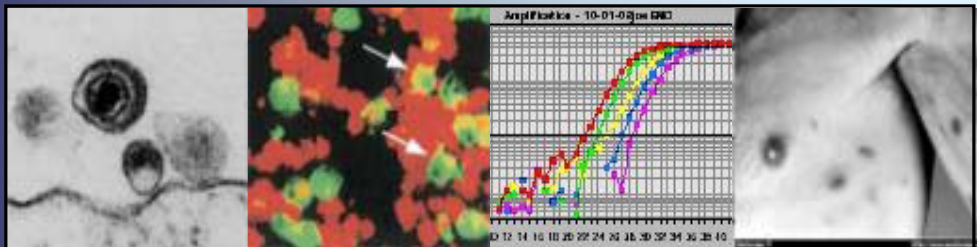


UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

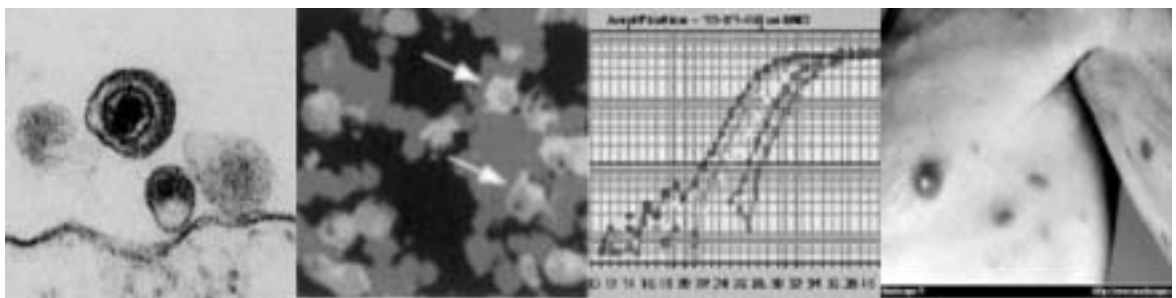
HERPESVIRUS HUMÀ 8: INFECCIÓ I PATOGÈNIA EN RELACIÓ AMB EL VIRUS D'EPSTEIN-BARR



ELISA MARTRÓ CATALÀ, 2004
TESI DOCTORAL

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

HERPESVIRUS HUMÀ 8: INFECCIÓ I PATOGÈNIA EN RELACIÓ AMB EL VIRUS D'EPSTEIN-BARR



ELISA MARTRÓ CATALÀ, 2004



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

HERPESVIRUS HUMÀ 8: INFECCIÓ I PATOGÈNIA EN RELACIÓ AMB EL VIRUS D'EPSTEIN-BARR

Memòria presentada per
Elisa Martró Català per optar al
grau de Doctora en Biologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Vist i plau dels Directors de la Tesi:

Dr. Prof. Vicenç Ausina Ruiz

Dra. Lurdes Matas Andreu

Badalona, desembre de 2004

Als meus pares

*“Investigar és veure allò que tothom ha vist,
i pensar allò que ningú més ha pensat.”*

Albert Szent-Györgi

*“La veritat en ciència pot ser definida com
la hipòtesi de treball que millor s’ajusta
per obrir camí a la següent més ben ajustada.”*

Konrad Lorenz

*“La ignorància afirma o nega amb rotunditat;
la ciència dubta.”*

Voltaire

Agraïments

Agraeixo al meu director de tesi, el Dr. Vicenç Ausina, Catedràtic del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i Cap del Servei de Microbiologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, amb qui he estat treballant durant més de 7 anys, haver-me introduït en la investigació, que cregués en mi i em brindés l'oportunitat de realitzar una estada en un laboratori estranger per tal d'obrir el meu propi camí en la recerca. També per tot el que d'ell he après. La seva enorme capacitat de treball i productivitat, així com el seu entusiasme, han estat motivadors a l'hora de treballar. Finalment li agraeixo que m'animés a acabar la tesi aquest any. Agraeixo també a la meva directora de tesi, la Dra. Lurdes Matas, la qual ha estat al meu costat d'ençà que vaig començar com a estudiant de pràctiques al Servei de Microbiologia l'estiu del 1997, les seves opinions crítiques d'excel·lent professional que m'han ajudat a reflexionar. El seu suport humà i companyonia han estat sempre un estímul per a mi.

Agraeixo al Dr. Philip E. Pellett –*Head of the Herpesvirus Section, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta*– el fet d'acceptar-me com a estudiant predoctoral en el seu laboratori i de posar al meu abast tot l'equipament i reactius necessaris per al desenvolupament dels meus projectes. Treballar amb ell i adaptar-me al seu sistema va ser per a mi un gran repte, però sobretot li he d'agrair que m'ensenyés a ser independent a l'hora de determinar quin havia de ser el següent pas en les meves investigacions, a tirar sempre endavant enfront l'adversitat i poder-me demostrar a mi mateixa que podia arribar més lluny. També li he d'agrair el fer-me possible d'allargar la meva estada un segon any, fet que em va permetre d'ampliar i arrodonir els projectes en els quals m'havia embrancat. Em va ajudar a afinar la meva capacitat de redacció en anglès i em va permetre defensar les meves troballes davant de petits auditoris, així com davant d'altres més nombrosos i exigents. En definitiva, li he de donar les gràcies per donar-me les eines que tota persona que s'introdueix en el món de la recerca necessita per aconseguir allò que pretén.

A la Dra. Sheila C. Dollard, per supervisar el treball del meu primer projecte i ensenyar-me els secrets del desenvolupament de noves tècniques serològiques. També li agraeixo el fet de formar part del meu comitè avaluador junt amb el Dr. Philip E. Pellett i el Dr. Thomas J. Spira, de la *HIV Immunology and Diagnostics Branch*, a qui també vull agrair la seva instrucció pel que fa al punt de vista més clínic. Als meus companys de l'*Herpesvirus Section*: la Marlene, la Kay, la Wei, el Mitesh i la Felicia, per introduir-me en les tècniques serològiques i de PCR en temps real per a l'estudi de l'HVH-8 dissenyades en el mateix laboratori. Al Naoki, per les escasses però valuoses discussions sobre els meus experiments. També a l'Elisabet, el Shin i el Dr. Eng-Chun Mar, pel seu companyerisme. Al Mike i l'Scott, pel seu suport estadístic i científic. A tots ells, per compartir amb mi el dia a dia al CDC. A la Karen McCaustlan, de la *Core Facility*, per compartir amb mi els seus extensos coneixements sobre la optimització de reaccions multiplex de PCR en temps real, i per fer-me costat davant els èxits i fracassos dels meus experiments. A la Lee Lam, de l'*HIV Immunology and Diagnostics Branch*, per introduir-me en la citometria de flux i deixar-me utilitzar els seus citòmetres. Al Dr. Charles Humphrey, per ensenyar-me els herpesvirus amb el nou microscopi electrònic i per la seva complicitat.

Als meus amics íntims, companys de totes les vivències, bones i dolentes, durant els meus dos anys de vida a Atlanta, sense els quals no m'hagués sentit com a casa en el Nou Continent: la Silvina, el Dardo, el João, la Luisa, el Phil, l'Aurora, l'Aitor, el Juan, la Gorete, el Mariano, la Carolina i l'Elios. També a la resta de companys de la Villa International, per oferir-me la possibilitat de conèixer i aprendre els costums de persones d'arreu del món i obrir-me a nous horitzons. Igualment vull agrair profundament als meus amics d'aquí, amics per sempre, els que em coneixen tal i com jo sóc, el fet de mantenir el contacte i l'amistat d'ençà que vam començar a estudiar junts. Especialment a la Berta, a la Cris, a la Mariona i a la Raquel: sense el seu suport i la seva amistat absolutament sincera tot hauria estat més difícil. També als meus companys de facultat, amb qui hem compartit tants bons moments.

He de donar les gràcies també a tots els companys, presents i passats, del Servei de Microbiologia. Especialment, a l'Àgueda, per donar-me la possibilitat d'escriure els meus primers articles científics i pel seu suport; al Jose i a la Cristina Prat per fer-me sempre costat i oferir-me la seva orientació, suport i companyerisme; a la Manoli, a la Silvia, a la Marisol i a l'Aranxa, per la seva amistat dins i fora de l'hospital. Finalment, al Xavi i al Jose per llegir-se i criticar aquesta tesi, i al Javi per ajudar-me amb les figures.

Gràcies també als companys del Centre d'Estudis Epidemiològics sobre l'HIV/SIDA a Catalunya (CEESCAT). Especialment, al Dr. Jordi Casabona i a la Dra. Anna Esteve, per permetre'm continuar treballant amb l'Herpesvirus humà 8 en tornar dels EUA, i a la Diana, amb qui hem compartit la última etapa dels nostres doctorats.

Per acabar, em queda el més important. Vull agrair, de tot cor, a tota la meva família el fet d'estar sempre al meu costat i d'estar tots tan units: al meu germà Roger, als meus cosins, als meus tiets, i a la meva àvia. Molt especialment, agraeixo als meus pares el fet de que m'hagin donat totes les oportunitats per poder créixer tant a nivell personal com professional i que s'hagin preocupat sempre tant per mi. Els agraeixo també la seva comprensió i el seu suport davant totes les decisions que he anat prenent i, sobretot, la seva estimació. Andreu i Mireia, a vosaltres us dedico aquesta tesi.

And last but not least, a tota la resta de col·laboradors que han fet possible l'estudi presentat i que queden recollits en els agraïments dels dos articles publicats, així com a les persones que han accedit a proporcionar mostres clíniques per tal que aquest estudi es pogués realitzar.

Abreviatures.....	3
Resum	5
Articles en què es basa aquesta tesi	11
1. INTRODUCCIÓ.....	13
1.1. El Sarcoma de Kaposi (SK).....	13
1.2. El descobriment de l'Herpesvirus humà 8 (HVH-8)	16
1.3. Infecció primària per l'HVH-8	21
1.4. Altres malalties associades a l'HVH-8	22
1.5. Patogènia del SK.....	23
1.6. Cicle lític vs. cicle latent.....	26
1.7. El paper de la resposta immune en la replicació de l'HVH-8 i la patogènesi del SK	27
1.8. La rellevància del VIH / sida en la patogènesi del SK.....	28
1.9. Localització de l'HVH-8 en l'organisme i vies de transmissió	30
1.10. Tècniques serològiques per a la detecció de la infecció per l'HVH-8 ..	34
1.11. Seroprevalença de la infecció per HVH-8.....	36
1.12. Diagnòstic molecular de la infecció per l'HVH-8 i el SK	37
1.13. Sistemes experimentals per a l'estudi de la biologia de l'HVH-8.....	40
2. OBJECTIUS	43
2.1. Justificació de la unitat temàtica de la tesi	43
2.2. Objectius plantejats.	45
2.2.1. Caracterització de la taxa d'infecció i rutes de transmissió de l'HVH-8 en nens i adolescents, en comparació del virus d'Epstein-Barr (VEB) – Article I.....	45
2.2.2. Caracterització de la virèmia en la infecció per l'HVH-8 i del seu paper en la patogènia del SK – Article II.	46
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	47
3.1. Caracterització de la taxa d'infecció i rutes de transmissió de l' HVH-8 en nens i adolescents, en comparació del VEB (Article I).....	47

3.1.1. Seroprevalença de l'HVH-8.....	48
3.1.2. Seroprevalença del VEB.....	53
3.1.3. Relació entre l'HVH-8 i el VEB a nivell serològic	56
3.2. Caracterització de la virèmia en la infecció per l'HVH-8 i del seu paper en la patogènia del SK (Article II)	59
3.2.1. Desenvolupament i optimització dels mètodes	60
3.2.1.1. Assaig de dilucions limitants (LDA)	62
3.2.1.2. PCR en temps real	66
3.2.2. Caracterització de la infecció per HVH-8 en la línia cel·lular BCBL-1.....	69
3.2.3. Caracterització de la infecció per HVH-8 en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC)	71
3.2.4. Relació entre la càrrega vírica i la presència de lesions de SK	77
3.2.5. Diferències i semblances biològiques en la infecció de les PBMC pels dos gammaherpesvirus humans	79
3.2.6. Implicacions en el diagnòstic molecular.....	81
3.3. Limitacions i dificultats associades a l'estudi	85
4. CONCLUSIONS.....	87
5. BIBLIOGRAFIA	91
6. ARTICLES	117
7. ANNEX 1: Articles relacionats que no formen part de la tesi	131
8. ANNEX 2: Optimització de la reacció dúplex quantitativa de PCR en temps real.....	141
9. ANNEX 3: Estratègia que cal seguir per a una detecció fiable del genoma de l'HVH-8 en PBMC de pacients coinfectats amb el VIH	145
10. ANNEX 4: Informe dels tutors als <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (CDC)	147

Abreviatures

BCBL	<i>Body cavity based lymphoma</i> (limfoma anaplàsic de cavitats seroses)
CMH	Complex major d'histocompatibilitat
EBNA	Antigen nuclear del virus d'Epstein-Barr
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzim-immunoassaig)
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
HAART	<i>Highly-active antiretroviral treatment</i> (tractament antiretroviral de gran activitat)
HCMV	Citomegalovirus humà
HV γ 68	<i>Murid herpesvirus 4</i> o gammaherpesvirus murí 68
HVH-6	Herpesvirus humà 6
HVH-7	Herpesvirus humà 7
HVH-8	Herpesvirus humà 8
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IFA	Assaig d'immunofluorescència
LANA	<i>Latency-associated nuclear antigen</i>
LDA	<i>Limiting dilution assay</i> (assaig de dilucions limitants)
MCD	Malaltia de Castelman multicèntrica
MSM	<i>Men who have sex with men</i> (homes homosexuals i bisexuals)
ORF	<i>Open reading frame</i> (pauta oberta de lectura)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (cèl·lules mononuclears de sang perifèrica)
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
PE	Ficoeritrina
PEL	<i>Primary effusion lymphoma</i> (limfoma primari d'efusió)
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PTLD	<i>Post-transplant lymphoproliferative disease</i> (síndrome limfoproliferativa post-trasplantament)
RM	Ressonància magnètica

SK	Sarcoma de Kaposi
TAC	Tomografia axial computeritzada
TPA	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetat
VCA	Antigen de la càpside del virus d'Epstein-Barr
VEB	Virus d'Epstein-Barr
VHS	Virus de l'herpes simple
VIH	Virus de la immunodeficiència humana
VZV	Virus de la Varicel·la-Zoster

Resum

El sarcoma de Kaposi (SK), descrit per primera vegada el 1872, és una neoplàsia multifocal que s'origina en l'endoteli vascular i es presenta majoritàriament amb lesions a la pell, tot i que també pot afectar les mucoses i les vísceres. A principis dels anys vuitanta es va observar un gran nombre de casos de SK associat a la sida en homosexuals a Europa i els EUA en relació a l'epidèmia del VIH, que va causar l'alerta i la dedicació de la comunitat mèdica i científica. Posteriorment, la incidència d'aquest tipus de SK va disminuir en disminuir la incidència de la infecció pel VIH i amb la introducció de la teràpia antiretroviral de gran activitat (en anglès, HAART). Tot i això, si bé la HAART té un efecte beneficiós sobre les característiques clíniques del SK, s'ha vist que de fet no afecta la història natural d'aquesta malaltia. El SK és actualment la sisena malaltia indicativa de sida, i la primera causa de neoplàsia en pacients amb sida a l'Europa occidental. Per altra banda, en països en vies de desenvolupament que no tenen accés a tractaments, el SK ha assolit proporcions d'epidèmia en algunes zones, especialment a l'Àfrica central.

No va ser fins més d'un segle després de la primera descripció del SK quan, el 1994, es va descobrir l'agent causal d'aquesta neoplàsia, l'Herpesvirus humà 8 (HVH-8), i va ser classificat dins la subfamília dels *Gamma-herpesvirinae*, junt amb el virus d'Epstein-Barr (VEB), virus també potencialment oncogènic. D'ençà de llavors s'ha après molt, però queden encara molts interrogants per resoldre sobre la biologia, l'epidemiologia i la patogènia de l'HVH-8. El fet que la prevalença de la infecció per aquest virus superi la incidència del SK indica la presència de cofactors o factors protectors que juguen un paper molt important en el desenvolupament d'aquesta malaltia.

Amb aquesta tesi ens hem proposat respondre dues grans preguntes pel que fa a la detecció de la infecció per l'HVH-8 a partir de mostres de sang: quin

és l'abast de la infecció per l'HVH-8 a nivell de la població general, especialment en les dues primeres dècades de vida –a través de proves serològiques–, i quin és l'abast de la virèmia a nivell de població de risc per al desenvolupament del SK –a través de la detecció del mateix virus–. L'estudi d'aquests dos paràmetres ens ha portat a aprofundir en l'estudi de la seroepidemiologia i la patogènia de la infecció per l'HVH-8.

En els últims 10 anys s'han desenvolupat diversos assaigs serològics casolans poc estandarditzats, que es basen en antígens lítics o latents, donant resultats poc comparables. Aquest fet ha donat lloc a una intensa controvèrsia sobre la seroepidemiologia de la infecció per l'HVH-8. Mentre existeixen nombroses evidències que el virus es transmet per via sexual entre homes homo i bisexuals (MSM) en països no endèmics, la prevalença de la infecció en la població infantil i adolescent en aquestes zones és pràcticament desconeguda. Pocs estudis s'han centrat en aquesta població, els tamanys de mostra utilitzats han estat relativament petits, i els assaigs serològics poc sensibles en poblacions de baix risc. Per això es creu que la població infantil és bàsicament negativa per l'HVH-8 en els països occidentals i que, per tant, la infecció primària té lloc després de l'adolescència. En aquest camp hem estudiat la taxa d'infecció i les rutes de transmissió de l'HVH-8 en el grup de població que encara no ha arribat a l'edat sexualment activa utilitzant assaigs serològics prou sensibles i específics per poder determinar la presència o absència de la infecció per l'HVH-8 en aquesta població en zones endèmiques i no endèmiques pel virus. Per altra banda, hem analitzat la tendència de la seroprevalença de l'HVH-8 amb l'edat en comparació del VEB, l'herpesvirus humà filogenèticament més proper a l'HVH-8 i de transmissió horitzontal.

Els resultats d'aquest estudi indiquen que en zones no endèmiques per l'HVH-8, com Alemanya i Geòrgia (EUA), la taxa de seroprevalença per a aquest virus en els grups d'edat compresos entre els 6 mesos i els 17 anys és baixa, però no despreciable, tot i que la prevalença en aquestes regions és

significativament menor a l'observada en zones endèmiques, com ara Nigèria, on a més a més s'ha detectat un augment significatiu de la prevalença amb l'edat. En les dues zones no endèmiques estudiades no s'ha pogut observar aquesta tendència, probablement a causa de la baixa prevalença observada amb el tamany de mostra utilitzat. No obstant això, la via de transmissió horitzontal de l'HVH-8, tot i no ser tan eficient com per al VEB, també pot tenir lloc en aquestes zones, fent possible que la infecció primària tingui lloc abans d'arribar a l'edat sexualment activa. A més a més, hem comprovat que la seroprevalença del VEB és substancialment més gran a la de l'HVH-8 en les tres regions estudiades, i presenta una tendència creixent amb l'edat, reflectint la transmissió per via horitzontal.

Els resultats obtinguts demostren que la resposta serològica enfront de l'HVH-8 en zones endèmiques és més completa (incloent-hi la presència d'anticossos enfront de diversos antígens, tant lítics com latents), i els títols d'anticossos, tant enfront de l'HVH-8 com el VEB, són més elevats. Així mateix, els resultats mostren que l'assaig d'immunofluorescència (IFA), realitzat segons la metodologia descrita, és la tècnica serològica que permet detectar millor els individus infectats per l'HVH-8 en la població infantil i adolescent, tant en zones endèmiques com no endèmiques per aquest virus. Malgrat això, és important utilitzar diversos assaigs serològics enfront de diferents antígens vírics per poder assolir una sensibilitat més alta a l'hora de detectar la infecció per l'HVH-8.

Pel que fa a la detecció del genoma de l'HVH-8 en individus seropositius, existeix l'assumpció que la prevalença del virus a la sang és baixa (al voltant d'un 50%, fins i tot en pacients amb SK). Aquesta assumpció, iniciada a partir dels primers estudis que van utilitzar reaccions de PCR qualitatives, va continuar tot i el desenvolupament de reaccions quantitatives. Ningú no s'havia plantejat descriure amb detall les característiques de la virèmia per aclarir quines són les causes d'aquesta baixa detecció. Pel que fa al paper de la

virèmia en la patogènia del SK, hi ha grans preguntes que només estan parcialment respostes: es desconeix si el virus circulant en sang perifèrica representa una infecció lítica o latent; quina és la proporció de cèl·lules sanguínies infectades lítica i latentment; si les cèl·lules circulants poden actuar com a font de virus que doni lloc a la infecció d'altres teixits o si aquestes s'infecten en circular a través de les lesions del SK; i sobretot, si en pacients de SK o individus HVH-8 seropositius que són PCR negatius en sang, la càrrega vírica es troba per sota del nivell de detecció de les tècniques moleculars o el virus està realment absent. Amb aquest estudi ens vam voler plantejar si el fet que l'HVH-8 sigui poc prevalent en sang és a causa de limitacions metodològiques o no i, al mateix temps, vam voler aprofundir en la biologia de la infecció i la patogènia de l'HVH-8. Per donar una resposta a aquestes qüestions vam desenvolupar un mètode que no només va permetre estudiar la càrrega vírica de l'HVH-8 en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) i en plasma, sinó també establir per primera vegada quina és la freqüència de cèl·lules sanguínies infectades en un determinat volum de sang, així com el nombre de genomes vírics per cèl·lula infectada en pacients coinfectats amb el VIH.

Els resultats obtinguts demostren que la proporció de cèl·lules infectades per l'HVH-8 entre les PBMC és relativament baixa, fins i tot en pacients amb sarcoma de Kaposi actiu (fins a menys d'una en 6 milions). No obstant això, aquesta proporció varia entre individus i pot canviar en el decurs de la malaltia dins un mateix individu. El tipus de mostra escollida i el moment de recollida són decisius a l'hora de detectar el genoma víric en sang. L'HVH-8 es troba principalment infectant les PBMC, i en concret els limfòcits B. Per tant, les baixes taxes de detecció de l'HVH-8 en sang presentades fins ara en la literatura es deuen a que el volum de sang i la quantitat de DNA de PBMC utilitzats normalment en les reaccions de PCR han estat insuficients per a la detecció del virus en alguns casos, ja que tant la freqüència de PBMC infectades com la càrrega vírica són menors a les observades en altres infeccions víriques, com en el cas del VEB.

Pel que fa a la relació entre la virèmia i el SK, tot i que la detecció de l'HVH-8 en PBMC ha estat més habitual entre pacients amb SK, els quals tendeixen a presentar freqüències de cèl·lules infectades més elevades, la presència de lesions no sempre va acompanyada de la detecció del virus en sang. Tot i això, en els pacients HVH-8 seropositius amb o sense SK que presenten resultats de PCR negatius la freqüència de PBMC infectades pot estar per sota del límit de detecció. Els valors obtinguts de genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada, juntament amb la detecció del virus en plasma en alguns pacients, indiquen que si bé les PBMC presenten normalment una infecció latent, l'HVH-8 pot dur a terme també el cicle lític en un percentatge de les cèl·lules. Per tant, és plausible que aquestes PBMC líticament infectades contribueixin a la disseminació del virus cap a dianes endotelials contribuint a la patogènia del SK. Tot i això, els baixos valors de virèmia observats indiquen que el paper d'aquesta en la patogènia del SK pot no ser tan significatiu com en el cas de certes neoplàsies associades al VEB.

Finalment, en aquest estudi també hem vist que el nombre de genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada pot arribar a ser més baix en les PBMC dels pacients estudiats que en la línia cel·lular latentment infectada BCBL-1. Per tant, la latència en els limfòcits *in vivo* i en cèl·lules de limfoma transformades per l'HVH-8 podria estar regulada de manera diferent, com és el cas dels diferents tipus de latència del VEB associats a diferents patologies.

És necessari continuar estudiant la cinètica de la càrrega vírica al llarg de l'evolució de la infecció per l'HVH-8 i les diferents etapes del SK. Aquesta tesi proposa una nova metodologia que permetrà aprofundir en l'estudi detallat de la virèmia per l'HVH-8 i la seva rellevància en la patogènia tant del SK com d'altres malalties associades a aquest virus. Sobretot és important d'estandarditzar les condicions que s'han d'utilitzar per determinar la càrrega vírica i poder comparar els resultats dels diferents estudis. A això hem dedicat els nostres esforços. S'han establert les bases per assolir les condicions més

adequades de mostreig i d'anàlisi de mostres clíniques per obtenir uns resultats fiables.

Articles en què es basa aquesta tesi

Els articles següents descriuen i discuteixen els mètodes utilitzats i els resultats en els quals està basada la tesi:

Article I

Comparison of Human herpesvirus 8 and Epstein-Barr virus seropositivity among children in areas endemic and non-endemic for Kaposi's sarcoma.

Martró E, Bulterys M, Stewart JA, Spira TJ, Cannon MJ, Thacher TD, Bruns R, Pellett PE, and Dollard SC.

Journal of Medical Virology. 2004;72(1):126-31.

Article II

Evidence for both lytic replication and tightly regulated Human herpesvirus 8 latency in circulating mononuclear cells, with virus loads frequently below common thresholds of detection.

Martró E, Cannon MJ, Dollard SC, Spira TJ, Laney AS, Ou CY, and Pellett PE.

Journal of Virology. 2004;78(21):1107-11714.

Annex I: articles que complementen la tesi però que no en formen part.

Article III

Risk factors for Human herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma development among men who have sex with men in a European multicenter case-control study (EuroShaks).

Martró E, Esteve A, Whitby D, Schulz T, and Casabona J, for the Euro-Shaks working group.

En preparació.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El Sarcoma de Kaposi

El sarcoma de Kaposi (SK) és una neoplàsia endotelial caracteritzada per una intensa angiogènesi, infiltració de cèl·lules inflamatòries (limfòcits i macròfags) i proliferació de cèl·lules fusiformes típiques, d'origen probablement endotelial [Boshoff et al, 1997; Monini et al, 1999a]. El SK cursa amb màcules que progressen a nòduls angiomatosos i plaques violàcies que afecten principalment la pell, però que també poden afectar altres teixits com les mucoses, els teixits limfoides i les vísceres en fases avançades de la malaltia [Blauvelt, 1999]. El SK es diferencia de la majoria de tumors en el fet que és un desordre multifocal i policlonal i, a més a més, en les lesions hi podem trobar diferents tipus cel·lulars [Verma i Robertson, 2003]. El SK rarament afecta hostes immunocompetents, però pot arribar a ser fatal en pacients immunodeprimits; en alguns pacients on s'ha restaurat la competència immunitària, el SK ha remès, fet que el diferencia de tumors més agressius [Boshoff et al, 1997; Fiorelli et al, 1998]. La malaltia es presenta en quatre variants. Tot i tenir el mateix patró histològic, aquestes variants difereixen en les seves característiques epidemiològiques, clíniques i de pronòstic [Ablashi et al, 2002]. Aquest fet suggereix l'existència de cofactors que juguen un paper significatiu en el resultat de la infecció per l'HVH-8.

El SK clàssic va ser descrit per primera vegada el 1872 per Moritz Kaposi [Chatlynne i Ablashi, 1999] i afecta principalment a homes d'edat avançada d'origen mediterrani o d'Europa de l'est (especialment a Itàlia, Grècia, Turquia i Israel). La incidència d'aquesta malaltia és relativament baixa; només un 0.03% dels homes majors de 50 anys la desenvolupen [Blauvelt, 1999]. Així mateix, presenta un curs indolent amb lesions més predominants a les extremitats inferiors. Rarament, es pot complicar

afectant les vísceres [Iscovich et al, 2000] i, normalment, no resulta mortal [Hengge et al, 2002]. La immunosupressió associada a l'edat avançada ha estat proposada com a cofactor de la malaltia [Brenner et al, 2002]. Tot i que respon bé a la quimioteràpia i a la radioteràpia, aquesta variant del SK té tendència a fer recidives [Guillot et al, 2002]. Ocasionalment, les lesions poden resoldre's espontàniament i no tornar a aparèixer fins al cap d'un temps [Antman i Chang, 2000].

El **SK epidèmic** o **SK associat a la sida**, descrit als EUA el 1981 [Friedman-Kien et al, 1982], es caracteritza per la seva naturalesa agressiva i tendència a disseminar-se, i afecta individus infectats pel virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1), majoritàriament homes homo i bisexuals (MSM). El SK és la principal neoplàsia en pacients amb el VIH [Antman i Chang, 2000], i és una malaltia definitòria de sida. A principis dels anys vuitanta, es va observar un gran nombre de casos de SK en MSM a Europa i als Estats Units (EUA), en relació a l'epidèmia del VIH i la immunodepressió derivada d'aquesta infecció [Melbye et al, 1998; Renwick et al, 1998; O'Brien et al, 1999]. Posteriorment, la incidència d'aquest tipus de SK va davallar en disminuir la promiscuïtat sexual i la incidència del VIH [Casabona et al, 1991; Melbye et al, 1998; Rezza et al, 2000]. La introducció de la teràpia antiretroviral de gran activitat (en anglès, HAART) al voltant del 1996 als països occidentals també ha resultat en una disminució en la incidència de SK en pacients VIH positius, probablement a través de la restauració immunitària [Anderson et al, 1999] i l'efecte directe dels inhibidors de la proteasa com a factors antiangiogènics [Sgadari et al, 2002]. En un recent estudi europeu es van estudiar els canvis en la incidència del SK des de l'era pre-HAART (1994) fins el 2003 [Mocroft et al, 2004]. Aquest estudi ha demostrat que si bé la incidència del SK ha disminuït considerablement en l'era de la HAART, ho ha fet de manera similar a les altres malalties definitòries de sida, i que no hi ha hagut canvis significatius en la proporció de diagnòstics de sida que es donen a causa del SK, la qual s'ha mantingut estable al voltant del 6%. Tant els tractaments

antiretrovirals basats en inhibidors de la proteasa com en inhibidors de la transcriptasa inversa no nucleòsids s'han associat al control de la virèmia per l'HVH-8, però només després d'uns dos anys de tractament [Bourboulia et al, 2004]. Tot i que el SK és menys agressiu en pacients en HAART, aquest tractament no afecta la història natural del SK pel que fa a l'afectació de mucoses i nòduls limfàtics [Nasti et al, 2003]. Actualment, entre els individus que estan en HAART, els MSM i els pacients amb baixos recomptes de CD4 continuen tenint un risc més alt de desenvolupar SK. Cal tenir en compte que el SK és la sisena malaltia indicativa de sida en freqüència, i la principal neoplàsia en aquests pacients a l'Europa occidental [European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS i WHO and UNAIDS Collaborating Centre on AIDS, 2003].

El **SK endèmic** va ser descrit a l'Àfrica durant la dècada del 1940 com a càncer comú i freqüentment agressiu que afecta tant a adults amb una edat mitjana de 35 anys, com a nens al voltant dels tres anys d'edat [Parkin et al, 1999; Chokunonga et al, 1999]. Abans de l'aparició de la sida, el SK endèmic es trobava localitzat a l'Àfrica equatorial, i s'havia relacionat amb l'exposició crònica a sòls volcànics rics en aluminosilicats, la qual podria contribuir a una immunosupressió localitzada a les extremitats inferiors [Ziegler, 1993]. No obstant això, l'epidèmia de sida va provocar un fort augment de la prevalença de SK, arribant a ser el càncer més freqüent en homes i el segon més freqüent en dones a Uganda i Zimbabwe, i també va augmentar en nens [Dedicoat i Newton, 2003]. El curs clínic de la malaltia varia segons l'edat i és especialment agressiu en nens [Hengge et al, 2002].

Per últim, el **SK post-trasplantament** està relacionat amb tractaments immunosupressors i reverteix en retirar-se el tractament. Es pot presentar de manera crònica o bé amb una progressió ràpida [Hengge et al, 2002]. La prevalença és molt baixa a l'Europa occidental i als EUA, però representa al voltant d'un 80% de les neoplàsies post-trasplantament a Turquia i l'Aràbia Saudita [Qunibi et al, 1998; Duman et al, 2002]. En la

majoria dels casos, el SK es deu a la reactivació de l'HVH-8 després del trasplantament en pacients prèviament seropositius [Cattani et al, 2001]. La síndrome limfoproliferativa post-trasplantament (PTLD) causada pel virus d'Epstein-Barr (VEB) i el SK són els tumors més freqüents en individus que han rebut un trasplantament. Ambdós processos es caracteritzen per la seva reversibilitat en funció de l'estat del sistema immune, la presència de reservoris cel·lulars circulant en sang i l'associació a un herpesvirus [Herndier i Ganem, 2001].

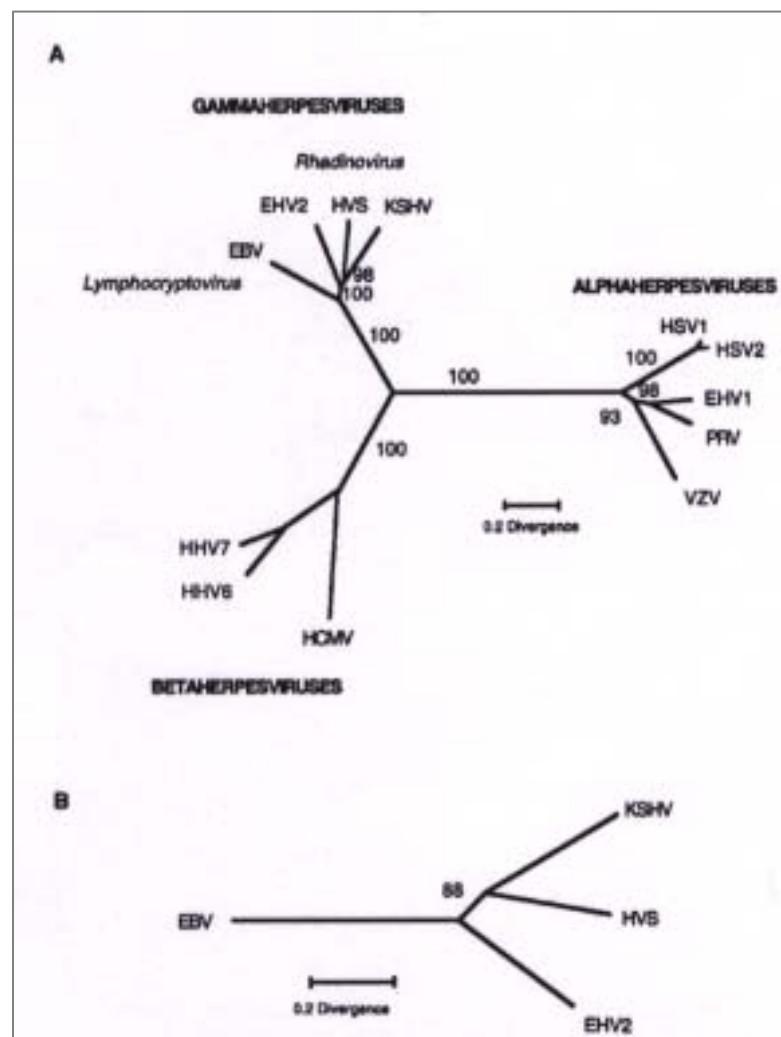
1.2. El descobriment de l'Herpesvirus humà 8

Tot i que Moritz Kaposi va suggerir per primera vegada que el SK podia tenir un origen infecció no va ser fins el 1994, més d'un segle més tard, quan es va descobrir l'Herpesvirus humà 8 (HVH-8) a partir d'una lesió de SK en un pacient amb sida [Chang et al, 1994]. Actualment hi ha prou evidència científica per demostrar que l'HVH-8, també anomenat herpesvirus associat al SK (en anglès, KSHV), és necessari per al desenvolupament d'aquesta malaltia, ja que s'ha detectat el genoma d'aquest virus en més del 95% de les lesions de SK [Moore i Chang, 1995].

L'HVH-8 és el membre més nou de la família *Herpesviridae*. Mitjançant *representational difference analysis*, va ser possible amplificar i caracteritzar seqüències de DNA úniques en teixit de SK que eren absents o presents en baixes quantitats en teixit no afectat del mateix malalt [Chang et al, 1994]. Aquestes seqüències van mostrar una identitat en la seqüència d'aminoàcids propera al 50% amb proteïnes del VEB i l'*Herpesvirus saimiri* (HVS). Un parell d'anys més tard ja s'havia seqüenciat el genoma de l'HVH-8 [Russo et al, 1996] i visualitzat els seus virions per microscopia electrònica [Renne et al, 1996], confirmant la classificació d'aquest nou virus com a pertanyent al gènere *Rhadinovirus* dins la subfamília dels *Gamma-herpesvirinae* (Figura 1). Tots els membres d'aquesta subfamília són

limfotròpics i estan freqüentment associats a malalties limfoproliferatives [Sarid et al, 1999]. Tot i causar malalties no limfoides com el SK, una proporció significativa del cicle vital de l'HVH-8 discorre en els limfòcits B [Ambroziak et al, 1995]. Dins la subfamília hi trobem dos gèneres. El gènere *Lymphocryptovirus* o gamma-1 inclou el VEB com a patògen humà i altres virus que afecten a altres primats; el gènere *Rhadinovirus* o gamma-2 inclou l'HVH-8 com a patògen humà i diversos virus que afecten a altres animals, incloent-hi l'HVS i el gammaherpesvirus murí 68 (HV γ 68) o *Murid herpesvirus 4* [Moore et al, 1996].

Figura 1. Arbre filogenètic de l'HVH-8 en relació als altres herpesvirus.

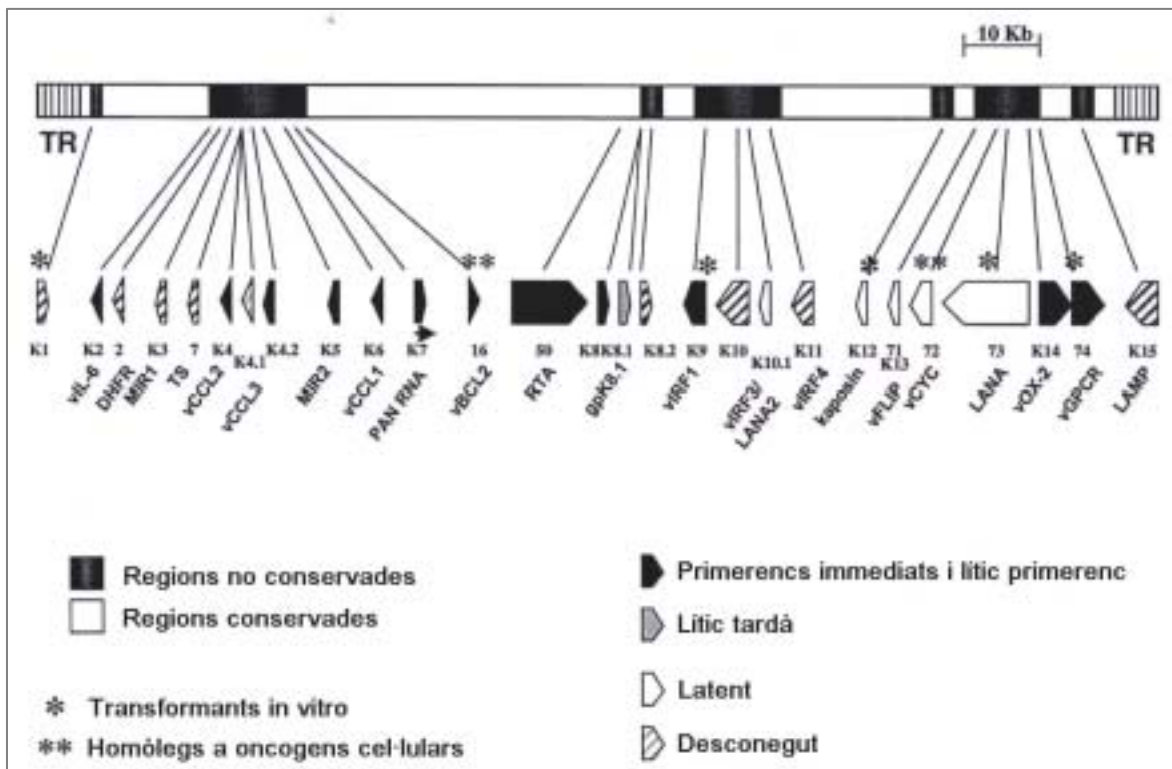


A: Arbre basat en la comparació de les seqüències aliniades d'aminoàcids pel gen MCP. La longitud de les branques de l'arbre és proporcional a la divergència (nombre mitjà de substitucions per posició). El percentatge de vegades que es va obtenir cada divisió de branques està indicat. **B:** Arbre basat en la comparació de les seqüències aliniades

d'aminoàcids pel complex de nou gens CS-1. Aquest arbre demostra que l'HVH-8 és més proper al sublinatge gamma-2, gènere *Rhadinovirus*. KSHV: Kaposi's sarcoma associated herpesvirus o Herpesvirus humà 8. HVS: *Herpesvirus saimiri*. EHV2: herpesvirus equí 2. EBV: virus d'Epstein-Barr. HSV1: virus de l'herpes simple tipus 1. HSV2: virus de l'herpes simple tipus 2. EHV1: herpesvirus equí 1. PRV: virus de la pseudoràbia. VZV: virus de la varicel·la-zoster. HCMV: Citomegalovirus humà. HHV6: herpesvirus humà 6. HHV7: herpesvirus humà 7. (Font: Moore et al. 1996).

L'HVH-8 té un genoma linial de DNA de doble cadena d'uns 165 Kpb, el qual es circularitza en forma d'episoma una vegada dins el nucli cel·lular. La regió central inclou aproximadament 100 gens flanquejats per dues repeticions terminals; molts dels gens són homòlegs als de l'HVS i s'han anomenat pautes obertes de lectura (*open reading frame*, ORF), mentre que 15 són gens únics i s'han designat de K1 a K15. Molts d'aquests últims són homòlegs a nivell de seqüència a gens humans [Russo et al, 1996; Neipel et al, 1997; Ablashi et al, 2002] (Figura 2).

Figura 2. Estructura del genoma de l'HVH-8.



La porció central del genoma està flanquejada per repeticions terminals (TR). El genoma comprèn unes 100 pautes obertes de lectura (ORF), moltes de les quals són compartides amb els altres membres de la família *Herpesviridae* (blocs blancs). Altres ORF són únics de la subfamília *Gammaherpesvirinae*, del gènere *Rhadinovirus* o de l'HVH-8, i estan presents

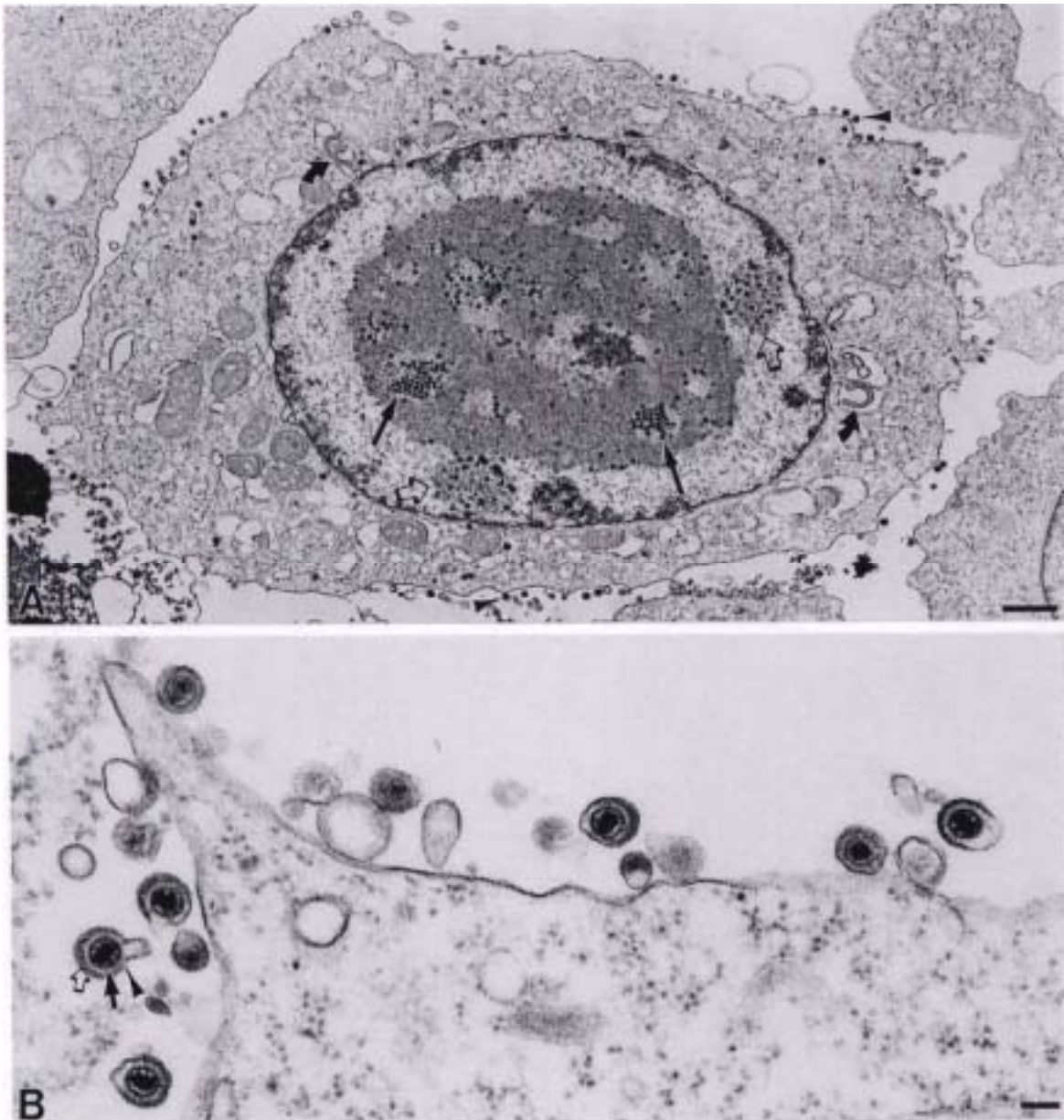
en els blocs negres. Els ORF pels quals no s'han trobat homòlegs en cap altre herpesvirus s'han designat amb una K. (Font: *Ablashi et al. 2002*).

L'HVH-8 té l'estructura típica dels herpesvirus, incloent-hi la càpside icosaèdrica, el tegument, i l'embolcall ric en glicoproteïnes, amb una mida total de 100-150 nm (Figura 3). La càpside està formada per quatre proteïnes estructurals, tres de les quals tenen una homologia significativa en la seva composició d'aminoàcids als virus de les subfamílies alfa i beta (ORF25, ORF62 i ORF26), a diferència de la quarta (ORF65) [Nealon et al, 2001]. Aquest alt grau de conservació de les proteïnes estructurals ha donat lloc a una manca d'especificitat en els assaigs serològics basats en cèl·lules que expressen antigens lítics. Per altra banda, els gens latents són majoritàriament únics per l'HVH-8.

A partir de la seqüenciació del seu locus més polimòrfic (K1), que presenta un 30% de variabilitat a nivell d'aminoàcids, s'han pogut diferenciar sis subtipus. La variant B es troba principalment a l'Àfrica; la C a l'Orient Mitjà i Àsia; la A i la C a Europa i EUA; la D a les illes del Pacífic; la E en els amerindis del Brasil; i la Z en nens de Zàmbia [Kasolo et al, 1998; Biggar et al, 2000; Kakoola et al, 2001; Zong et al, 2002] (Figura 4). Els subtipus estan estretament relacionats amb l'origen geogràfic i ètnic de l'hoste, i no amb la zona de residència en el cas d'immigrants. S'han realitzat estudis que indiquen que l'HVH-8 ha infectat la població humana des dels orígens de l'*Homo sapiens*, i que a partir de la variant B, s'haurien originat les altres seguint les ones de migració humana des d'Àfrica, però que posteriorment s'ha perdut en moltes poblacions i ja no és ubicu [Hayward, 1999; Moore i Chang, 2002]. L'*orf* K1 està possiblement relacionat amb la patogènia del SK, ja que codifica per una proteïna implicada en l'evasió del sistema immune i amb activitat transformadora. Tot i això, no s'ha pogut demostrar l'associació entre un subtipus concret i una determinada forma clinicoepidemiològica del SK, el grau de progressió del SK, o altres malalties associades a l'HVH-8 [Dourmishev et al, 2003]. La

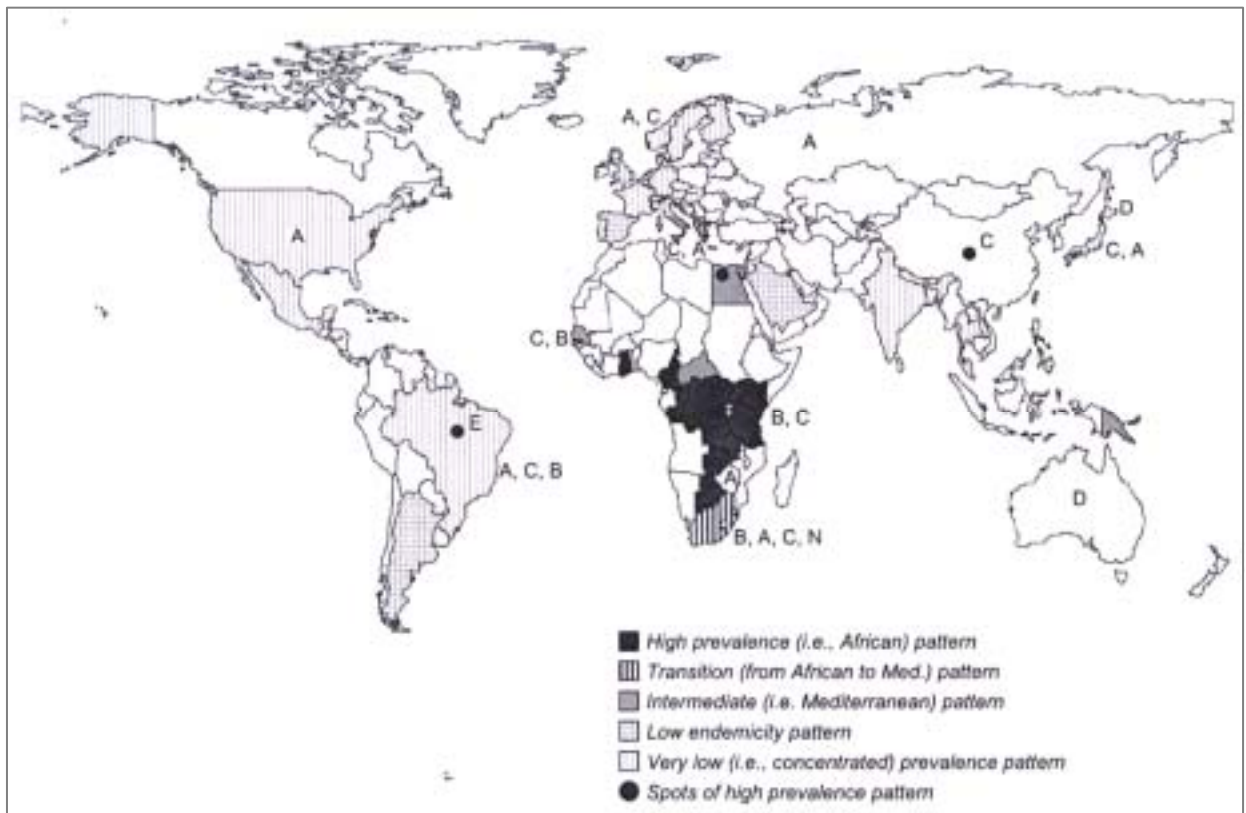
determinació dels subtipus ha estat útil en l'estudi epidemiològic dels contagis a través de trasplantament d'òrgans.

Figura 3. Microscopia electrònica de virions de l'HVH-8 en cèl·lules BCBL-1 incubades amb butirat (0.3 mM) durant cinc dies.



A: En el nucli cel·lular podem observar nucleocàpsides (fletxes rectes), material core-like (fletxes blanques) i embolcalls de membrana nuclear (fletxes corbes). Fora de la cèl·lula podem observar partícules víriques (puntes de fletxa). La barra equival a 1 μm . **B:** Les partícules víriques extracel·lulars consisteixen en una nucleocàpside (fletxa negra), envoltada del tegument (fletxa blanca), i l'embolcall (punta de fletxa). El tegument a vegades s'adhereix a l'embolcall. La barra equival a 100 nm. (Font: Yu et al. 1999).

Figura 4. Distribució mundial de l'HVH-8. Patrons epidemiològics basats en les dades de prevalença disponibles.



Les lletres (A-E) indiquen els diferents genotips (*Font: Duckers i Rezza, 2003*).

1.3. Infecció primària per l'HVH-8

Segons els estudis realitzats fins ara, la primoinfecció per l'HVH-8 no està associada a una morbiditat elevada en individus immunocompetents. Per una banda, alguns d'aquests estudis s'han realitzat en nens de regions d'alta prevalença del virus, en els quals la primoinfecció estava associada a síndromes febrils i, en alguns casos, a una erupció cutània maculopapular [Kasolo et al, 1997; Gessain et al, 1999; Andreoni et al, 2002]. Per altra banda, també s'han realitzat estudis longitudinals en adults sexualment actius en països occidentals, i s'han observat símptomes de febre, diarrea, cansament, erupció cutània localitzada i limfadenopaties associats a la seroconversió per l'HVH-8 [Wang et al, 2001].

En els individus infectats per l'HVH-8 que acaben desenvolupant SK, la durada del període entre la infecció i el desenvolupament de la malaltia sembla estar més relacionada amb l'estat immune del pacient que amb el temps transcorregut des de la infecció. Per exemple, en pacients amb sida aquest període pot ser de setmanes a mesos i en individus infectats a través d'un trasplantament és de dos a sis mesos. També s'ha observat que el risc de SK és més alt entre els individus que seroconverteixen per l'HVH-8 després d'haver seroconvertit pel VIH-1 que a la inversa [Renwick et al, 1998; Jacobson et al, 2000; Cannon i Pellett, 2001].

1.4. Altres malalties associades a l'HVH-8

A part dels quatre tipus de SK, l'HVH-8 també s'ha associat a desordres limfoproliferatius, els quals tenen un menor impacte clínic que el SK.

El **limfoma anaplàsic de cavitats seroses** (*body cavity-based lymphoma, BCBL*) o limfoma primari d'efusió (*primary effusion lymphoma, PEL*) és un limfoma de cèl·lules B no-Hodgkin [Cesarman et al, 1995]. Es tracta d'un desordre molt poc habitual però ràpidament fatal, que afecta principalment a individus en fases avançades d'infecció pel VIH, però també a individus VIH seronegatius. Típicament s'observa una efusió neoplàsica pleural o pericàrdica, tot i que també es pot presentar com una massa sòlida en els nòduls limfàtics, el pulmó o el tracte intestinal [Arvanitakis et al, 1997]. A partir de pacients amb aquesta malaltia s'han establert diverses línies cel·lulars que han demostrat que el BCBL es pot donar també com a fruit de la coinfecció per l'HVH-8 i el VEB [Renne et al, 1996; Arvanitakis et al, 1997]. Mitjançant *Southern blot* s'ha vist que aquestes línies cel·lulars contenen de 50 a 150 còpies del genoma de l'HVH-8 per cèl·lula, un nombre força més elevat del que es troba en les cèl·lules fusiformes del SK (25-30 còpies) [Arvanitakis et al, 1997; O'Neill et al, 1997; Stamey et al, 2001].

La **malaltia de Castelman multicèntrica** (en anglès, **MCD**) és un desordre limfoproliferatiu poc freqüent, que es creu que està mediat per la sobreexpressió de la interleuquina IL-6 [Soulier et al, 1995]. L'HVH-8 es pot detectar en la majoria de malalts de MCD VIH seropositius però només en el 40% dels VIH seronegatius. Els casos de MCD positius per l'HVH-8 s'engloben en la subcategoria de MCD plasmablàstica, en la qual s'observen grans cèl·lules plasmablàstiques que contenen el virus [Dupin et al, 2000].

La infecció per l'HVH-8 també s'ha associat a altres patologies, incloent-hi malalties malignes i no malignes. Entre elles hi ha alguns angiosarcomes, la hiperplàsia angiolímfoides amb eosinofília, carcinomes de la pell en pacients immunodeprimits (carcinoma de cèl·lules escamoses i malaltia de Bowen), la sarcoidosi, el mieloma múltiple, el pèmfig, el limfoma immunoblàstic associat a la sida, el limfoma primari de sistema nerviós central, desordres limfoproliferatius post-trasplantament, i el tumor miofibroblàstic inflamatori pulmonar, entre d'altres. Tot i això, l'associació amb la majoria d'aquests desordres no ha estat confirmada i encara existeix controvèrsia al respecte [Ablashi et al, 2002; Henke-Gendo i Schulz, 2004].

1.5. Patogènia del SK

L'HVH-8, com els altres membres de la subfamília dels gammaherpesvirus, és un virus limfotròpic. Després d'entrar a l'organisme, es creu que els limfòcits B són la principal diana d'infecció i el virus hi estableix una infecció latent [Ambroziak et al, 1995; Decker et al, 1996; Mesri et al, 1996], tot i que altres cèl·lules mononuclears com els monòcits poden ser susceptibles a la infecció [Blasig et al, 1997]. Durant la fase latent, el virus persisteix en el nucli de les cèl·lules infectades en forma de diverses còpies de DNA circular episòmic no integrat [Boshoff et al, 1995]. Durant aquest període, el virus expressa un petit nombre de gens, incloent-hi l'*orf 73* que codifica per la proteïna nuclear LANA1 (*latency-associated*

nuclear antigen 1). Aquesta proteïna, a part de regular la transcripció, manté els episomes units al DNA cromosòmic de la cèl·lula hoste, assegurant la seva correcta segregació durant la divisió cel·lular i mantenint un nombre de còpies relativament estable [Ballestas et al, 1999; Cotter i Robertson, 1999].

Com succeeix en la infecció per altres herpesvirus, la latència pot anar seguida d'un període de reactivació del cicle lític, generalment observat en pacients immunodeprimits o d'edat avançada [Blauvelt, 1999]. En la fase lítica, el genoma de l'HVH-8 es replica pel mecanisme del cercle rodant generant nous virions, i hi ha un augment de la càrrega vírica en sang. Durant aquesta fase la infecció es pot estendre a teixits no limfoides com l'endoteli, on el virus estableix una infecció latent secundària en les primeres etapes de la patogènesi del SK [Staskus et al, 1997]. La proteïna codificada per l'*orf* 50, és expressada molt aviat en el cicle lític, actua com a activador de la transcripció i indueix l'expressió en cascada dels gens lítics, així com la seva pròpia, essent essencial i suficient per a desencadenar el cicle lític [Lukac et al, 1998; Chen et al, 2001]. Tot i que el coneixement de les circumstàncies que porten a aquesta activació seria molt valuós a l'hora d'identificar possibles cofactors del SK, aquestes no són ben conegudes. La reactivació vírica *in vivo* es creu que té lloc quan les cèl·lules latentment infectades que es troben en sang es veuen exposades a ambients amb alts nivells de citoquines inflamatòries en circular a través de determinats teixits [Mesri, 1999]. En la seva fase primerenca, el SK és una malaltia mediada per citoquines i és similar a un procés inflamatori [Iscoovich et al, 2000].

Els virus grans de DNA, com són els herpesvirus i els poxvirus, durant la seva evolució han incorporat al seu genoma diversos gens d'origen cel·lular. El genoma de l'HVH-8 conté diversos gens homòlegs als de la cèl·lula hoste i que tenen un rol potencial en la patogènesi del SK, ja que estan implicats en l'evasió del sistema immune, la desregulació del creixement cel·lular i la inducció de l'angiogènesi [Blauvelt, 1999]. La

resposta antivírica de l'hoste freqüentment implica la inducció de l'apoptosi en les cèl·lules infectades, però els gens vírics vIL-6, vFLIP i vBcl-2 poden inhibir aquest procés. A més a més, el vIRF interfereix en la presentació d'antígens pel complex major d'histocompatibilitat (CMH) induïda per l'IFN- β , així com en la resposta immune cel·lular. La proteïna vFLIP també inhibeix l'activació de la resposta immune innata, mentre que l'ORF K3, l'ORF K5 i la proteïna vMIP inhibeixen la resposta immune mediada per cèl·lules. Finalment, les proteïnes LANA1, vCYC i vGCR tenen activitat mitogènica i reguladora del cicle cel·lular [Moore i Chang, 2002; Damania, 2004].

Les proteïnes K1, vIRF, kaposina A i vGCR tenen la capacitat de transformar cèl·lules en cultiu [Moore i Chang, 2002]. No obstant això, a diferència del VEB, l'HVH-8 no és capaç de transformar limfòcits B *in vitro*. Alguns experiments han demostrat la immortalització de cèl·lules endotelials en cultiu després de l'exposició al virus, però el genoma de l'HVH-8 només va ser detectat en una petita subpoblació de les cèl·lules [Flore et al, 1998]. Aquest fet indica que la progressió de la infecció requereix altres cofactors. L'expressió dels gens vírics també podria tenir diferents patrons específics de teixit, ja que s'ha vist que l'expressió d'alguns gens vírics, per exemple el vIL-6 i el LANA2, està regulada per factors de transcripció cel·lulars en els limfòcits B [Parravicini et al, 2000]. Mentre s'ha observat que en el PEL la infecció per l'HVH-8 és monoclonal i els tumors estan formats per limfòcits B transformats, les lesions de SK són generalment oligo o policlonals, probablement evolucionant cap a monoclonals a mesura que avança la malaltia. Per altra banda, en la MCD les cèl·lules infectades representen una petita part del tumor i estan localitzades a la zona més externa dels centres germinals afectats [Moore i Chang, 2002].

El SK afecta ambdós sexes de manera diferent; presenta una alta relació home:dona (des de 3:1 pel SK clàssic, fins a 15:1 pel SK epidèmic) [Plancoulaine et al, 2002]. En estudis en ratolí, s'ha observat que les

cèl·lules fusiformes explantades de lesions de SK creixen més ràpidament i formen tumors més grans en ratolins mascle que femella [Albini et al, 2001]. Posteriorment s'ha descobert que la hormona femenina gonadotropina coriònica, i més específicament la RNAsa anomenada neurotoxina derivada dels eosinòfils (present en les preparacions pures de gonadotropina coriònica humana) té una potent activitat citotòxica específica sobre les cèl·lules del SK, que ha estat confirmada clínicament [Hermans et al, 1998].

1.6. Cicle lític vs. cicle latent

El fet de sobreviure en l'hoste de manera latent de per vida i la capacitat de reactivació al cap de molts anys després de la infecció primària, són característics dels herpesvirus. A partir de l'estudi dels limfomes induïts pel VEB, es va elaborar un model d'oncogènesi, en el qual l'expressió dels gens associats a la replicació latent del virus donen lloc a proteïnes que estimulen vies de senyalització implicades en la proliferació cel·lular i en la inhibició de l'apoptosi. Més recentment, s'ha establert que si bé les proteïnes expressades durant el programa latent són essencials per a la transformació cel·lular, algunes proteïnes del cicle lític també podrien participar en la tumorigènesi de manera paracrina [Damania, 2004].

Pel que fa a l'HVH-8, si bé la immensa majoria de les cèl·lules en les lesions de SK expressen proteïnes latents amb propietats reguladores del creixement contribuint així a la patogènesi de manera autocrina, es creu que el control de la reactivació de l'HVH-8 podria contribuir directament a la patogènesi del SK a través de l'expressió de gens lítics [Cesarman et al, 2000; Ensoli et al, 2000]. Les cèl·lules líticament infectades produeixen factors paracrins que podrien influenciar els components angiogènics i/o inflamatoris de la lesió [Boshoff et al, 1997]. Hi ha proteïnes lítiques que inhibeixen el sistema immune o fan possible que les cèl·lules infectades

escapin al seu control, a part de desregular el creixement cel·lular [Dourmishev et al, 2003]. A més a més, la replicació lítica podria ser crítica per a la disseminació del SK; els pacients amb SK tenen més probabilitats de presentar el genoma víric a la sang que aquells individus HVH-8 seropositius sense SK, i tenen títols més elevats d'anticossos enfront d'antígens lítics [Cannon et al, 2003; Engels et al, 2003].

1.7. El paper de la resposta immune en la replicació de l'HVH-8 i la patogènesi del SK

La immunosupressió pot augmentar o contribuir a la progressió del SK, ja que aquesta neoplàsia respon a la HAART en pacients amb sida [Sirianni et al, 2002; Wilkinson et al, 2002], i també es resol quan la teràpia immunosupressora es discontinua en pacients amb SK post-trasplantament [Verma i Robertson, 2003].

La immunitat cel·lular juga un paper important en el control de la infecció per l'HVH-8. Els pacients de SK i individus amb un elevat risc per al SK, com són els MSM, pacients VIH positius o d'edat avançada i d'origen mediterrani, mostren respostes immunes caracteritzades per l'activació dels limfòcits T CD8⁺ i alts nivells de citoquines del tipus Th1 (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , entre d'altres) en sèrum [Ensoli et al, 2000]. Aquestes citoquines són produïdes per cèl·lules inflamatòries (limfòcits i monòcits / macròfags) presents en les lesions primerenques del SK, així com per les PBMC en pacients amb SK [Sirianni et al, 1998]. Per tant, la patogènesi de l'HVH-8 depèn críticament de la presència de senyals inflamatòries apropiades generades en les lesions del SK. Les citoquines inflamatòries indueixen l'expressió de factors angiogènics, que a la vegada medien el creixement de les cèl·lules tumorals fusiformes, l'angiogènesi i l'edema que caracteritzen les lesions del SK. Aquestes citoquines també indueixen l'adquisició del

fenotip característic de les cèl·lules del SK en les cèl·lules endotelials, incloent-hi la morfologia fusiforme, el fenotip angiogènic i l'expressió dels mateixos marcadors cel·lulars [Ensoli et al, 2000].

Diversos grups han estudiat l'efecte de les citokines inflammatòries en la replicació de l'HVH-8. Aquestes investigacions apunten cap a l' IFN- γ com a la citokina amb un potencial més clar per influenciar el cicle de l'HVH-8. L' IFN- γ és una de les citokines alliberades pels limfòcits T recuperats de lesions de SK i és la principal citokina involucrada en la resposta Th1. En les lesions de SK, la infiltració de limfòcits T CD8⁺ i la presència d'IFN- γ precedeix o coincideix amb la detecció de l'HVH-8 per PCR [Fiorelli et al, 1998; Sirianni et al, 1998]. Així mateix, en els primers assaigs clínics de tractaments pel SK, l'IFN- γ va donar lloc a la progressió de la malaltia [Chang et al, 2000]. Pel contrari, l'IFN- α mostra una certa activitat inhibidora sobre la producció i/o l'alliberació de partícules víriques per part de les cèl·lules BCBL-1 tractades amb TPA, i aquesta activitat és dosi-dependent. A més a més, la producció d'aquesta citokina per part de les PBMC de pacients amb SK s'associa a la pèrdua del genoma víric durant el cultiu [Monini et al, 1999a].

Finalment, com ja s'ha descrit en l'apartat 1.5, alguns dels gens de l'HVH-8 homòlegs a gens cel·lulars tenen la capacitat d'interferir en la regulació de la resposta immune.

1.8. La rellevància del VIH/sida en la patogènesi del SK

El SK és la neoplàsia més freqüent en MSM amb sida [Goedert, 2000]. El SK és molt agressiu en aquesta població; les lesions evolucionen ràpidament cap a tumors i es dissemina fàcilment cap a les vísceres, causant una alta mortalitat [Schwartz, 1996; Hengge et al, 2002]. La

principal causa de mort atribuïble al SK en pacients VIH positius és una afectació extensa del pulmó amb o sense hemorràgia.

El VIH és un cofactor necessari per al desenvolupament ràpid del SK. El temps des de la seroconversió per l'HVH-8 al desenvolupament de SK epidèmic és normalment d'un a quatre anys, tot i que pot arribar fins uns 10 anys [Gao et al, 1996a; Martin et al, 1998; Renwick et al, 1998] mentre que pel SK clàssic, aquest període pot durar diverses dècades [Kowalzik et al, 1998].

Un estudi realitzat a l'Àfrica va demostrar que tot i la similitud en la prevalença de la infecció per l'HVH-8 en pacients positius pel VIH-1 i pel VIH-2, els primers tenen un risc de desenvolupar SK 12.4 vegades més alt [Ariyoshi et al, 1998]. Aquest fet indica que el desenvolupament del SK no es pot explicar únicament per la immunosupressió observada en aquests pacients. El VIH-1 podria influenciar el desenvolupament del SK de diverses maneres.

En individus coinfectats pel VIH-1 i l'HVH-8, l'ordre en el qual aquestes dues infeccions s'adquireixen és rellevant: s'ha demostrat que en aquells pacients que seroconverteixen per l'HVH-8 quan ja són VIH-positius, el SK es desenvolupa més ràpidament que en aquells que s'han infectat primer amb l'HVH-8 i després amb el VIH-1, com ja s'ha explicat en el punt 1.3. La progressió a SK també s'ha relacionat amb nivells alts de càrrega vírica del VIH-1 [Jacobson et al, 2000; Engels et al, 2003], tot i que aquests resultats no sempre han estat corroborats [Quinlivan et al, 2002].

Una de les proteïnes codificades pel genoma del VIH-1, la proteïna Tat, podria estar directament relacionada amb la patogènia del SK associat a la sida. A nivell extracel·lular, aquesta proteïna és capaç d'estimular els macròfags derivats de monòcits cultivats *in vitro* a secretar IL-8 i Gro- α ; aquestes dues quimioquines tenen la capacitat d'estimular les cèl·lules

endotelials afavorint l'angiogènesi [Lane et al, 2002]. A més a més, la proteïna Tat afavoreix el creixement i la supervivència de les cèl·lules responsables del SK, exercint una funció antiapoptòtica [Ensoli et al, 1990; Barillari et al, 1993]. També s'ha observat que la replicació del VIH-1 en línies cel·lulars derivades del PEL és capaç de reactivar el cicle lític de l'HVH-8 [Varthakavi et al, 1999].

Alguns estudis han trobat una correlació directa entre la infecció pel VIH-1, la patogènesi de la sida i la progressió del SK. Tant la infecció per l'HVH-8 com el SK s'han relacionat amb recomptes baixos de limfòcits CD4⁺ [Goedert et al, 1987; Martin et al, 1998]. Per altra banda, altres estudis han suggerit que la relació amb el recompte de CD4 vindria condicionada de fet per l'edat (els individus VIH-1 seropositius que seroconverteixen per l'HVH-8 a una edat més avançada tenen recomptes de CD4 més baixos que individus més joves) [Varthakavi et al, 1999].

Tot i això, només un 30-50% dels individus coinfectats desenvolupen SK en un període de fins a 10 anys [Martin et al, 1998; O'Brien et al, 1999; Rezza et al, 1999; Jacobson et al, 2000] i, per tant, altres cofactors o factors de risc podrien estar involucrats en la patogènia d'aquesta malaltia.

1.9. Localització de l'HVH-8 en l'organisme i vies de transmissió

Mitjançant tècniques de PCR *in situ*, hibridació *in situ* i microscopia electrònica, l'HVH-8 ha estat localitzat en les cèl·lules tumorals fusiformes i en leucòcits infiltrats en el tumor. També s'ha detectat el virus en diversos fluids corporals.

Els estudis epidemiològics realitzats fins avui han demostrat que l'HVH-8 és transmès sexualment entre grups d'alt risc, especialment entre MSM, en països on el SK no és endèmic. El fet que hi hagués una epidèmia d'HVH-8 entre MSM parcialment solapada amb l'epidèmia del VIH, indica que alguns factors de risc per a la infecció amb aquests dos virus podrien ser comuns. La prevalença de l'HVH-8 en MSM VIH-positius és alta i varia d'un 30% al Regne Unit a un 65% a Itàlia [Simpson et al, 1996; Gao et al, 1996b; Calabro et al, 1998]. L'exposició per via sexual és el factor de risc més fortament associat a la infecció per l'HVH-8, així com tenir història de malalties de transmissió sexual prèvia al diagnòstic de SK [Martin et al, 1998]. El risc de desenvolupar SK és més de 10.000 vegades més alt en MSM VIH-positius que en la població general [Goedert, 2000], mentre que s'observa una baixa prevalença de l'HVH-8 (7-11%) i un baix risc de SK entre hemofílics i usuaris de drogues per via parenteral amb sida [Beral et al, 1990; Simpson et al, 1996; Calabro et al, 1998]. L'HVH-8 ha estat detectat per PCR en el tracte urogenital i teixit prostàtic [Monini et al, 1996; Diamond et al, 1998; Stamey et al, 2001] així com en mostres de fluid seminal de pacients amb SK [Lin et al, 1995; Monini et al, 1996; Pellett et al, 1999; Stamey et al, 2001], tot i que existeix encara una certa controvèrsia al respecte. La identificació de comportaments sexuals específics (pràctiques oro-anals, oro-genitals o ano-genitals receptives o insertives) entre MSM ha estat conflictiva degut a l'existència de diverses fonts de biaix en els estudis de factors de risc [Martin i Osmond, 2000]. Per altra banda, la transmissió heterosexual és una via de transmissió poc freqüent: el genoma de l'HVH-8 es detecta en baixes proporcions (8%) en secrecions cervicovaginals de dones VIH-positives [Rezza et al, 2001], i la presència d'anticossos enfront de l'HVH-8 en dones VIH-negatives només està associada a activitats sexuals d'alt risc [Tedeschi et al, 2000].

Altres rutes de transmissió juguen un paper important en països endèmics per al SK, on l'HVH-8 és més prevalent en la població general. Si bé en els estudis realitzats fins ara en zones no endèmiques dels EUA i

Europa han demostrat prevalences molt baixes en la població infantil (del 0 al 4%) [Lennette et al, 1996; Blauvelt et al, 1997; Chandran et al, 1998a; Chandran et al, 1998b], tant a Itàlia [Whitby et al, 2000] com en països africans, la infecció per HVH-8 té lloc també durant la infància. Diversos estudis han demostrat que la transmissió per via horitzontal [Mayama et al, 1998; LaDuca et al, 1998; Andreoni et al, 1999; Calabro et al, 2000] o vertical [Bourboullia et al, 1998; Plancoulaine et al, 2000] és freqüent en nens africans, els quals es poden veure afectats per un SK fulminant d'evolució molt ràpida [Ziegler i Katongole-Mbidde, 1996]. En regions endèmiques d'Àfrica, la taxa de seroprevalença en nens assoleix els nivells observats en els adults abans d'arribar a la pubertat, mentre que la infecció per aquest virus és poc freqüent abans dels dos anys d'edat [Mayama et al, 1998]. L'HVH-8 ha estat detectat per PCR en mostres de saliva en pacients seropositius [Vieira et al, 1997; Koelle et al, 1997; Pauk et al, 2000; Blackburn et al, 2000; Stamey et al, 2001; Cannon et al, 2003], i per tant és possible que l'HVH-8 es transmeti horitzontalment de manera similar al VEB, com indica aquesta tendència de la prevalença a augmentar amb l'edat, típica d'aquest tipus de transmissió. Per altra banda, en una zona endèmica de la Guaiana Francesa, Plancoulaine *et al.* van trobar una forta correlació entre la seroprevalença de l'HVH-8 entre mare i fill, però la seroprevalença en nens menors de cinc anys era relativament baixa. Això indicaria que si existeix transmissió durant l'embaràs, el part, o l'alletament, aquesta no seria una via predominant, sinó que la correlació entre mare i fill podria venir donada pel contacte interpersonal proper a través de la saliva, fet que també explicaria la correlació trobada entre germans [Plancoulaine et al, 2000]. Tot i això, els resultats dels darrers estudis al respecte són contradictoris [Henke-Gendo i Schulz, 2004].

L'HVH-8 també pot ser detectat en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC), principalment en limfòcits B i monòcits, i rarament en limfòcits T [Blauvelt, 1999]. Mentre les cèl·lules tumorals fusiformes estan infectades de manera latent, els monòcits poden mostrar una infecció lítica

[Blasig et al, 1997]. En aquest sentit, s'han descrit casos de transmissió de l'HVH-8 a través de transfusions de sang i trasplantament d'òrgans [Blackbourn et al, 1997; Parravicini et al, 1997; Luppi et al, 2000].

Un estudi realitzat en dones usuàries de drogues per via parenteral també va aportar evidències de transmissió a través de xeringues compartides observant-se una relació directa entre el nivell de consum i la seroprevalença, però aquesta transmissió era menys eficient que pel VIH o el virus de l'hepatitis C [Cannon et al, 2001]. En general es considera que la transmissió de l'HVH-8 per via parenteral és poc comú; la seroprevalença d'aquest virus en usuaris de drogues per via parenteral és baixa [Schulz, 1999], i l'observada en receptors de transfusions o hemofílics no difereix gaire de la dels controls [Simpson et al, 1996; Lennette et al, 1996; Gao et al, 1996b]. Estudis realitzats en donants de sang al Regne Unit i França no van detectar el genoma de l'HVH-8 en sang perifèrica de cap dels donants [Lebbe et al, 1997; Whitby et al, 1998], però estudis al sud d'Itàlia van trobar prevalences del 8-10% en individus sans [Bigoni et al, 1996; Viviano et al, 1997]. Tot i això, s'ha de tenir en compte que les diferències en sensibilitat dels diferents protocols de PCR utilitzats, així com la presència de falsos positius deguts a contaminacions, fan que la serologia sigui més fiable a l'hora d'estudiar l'epidemiologia de l'HVH-8. Més recentment es va realitzar un estudi exhaustiu en donants de sang d'EUA i es va observar una seroprevalença al voltant del 3% [Pellett et al, 2003].

Pel que fa als trasplantaments, el SK representa un 3-8% dels tumors en pacients trasplantats, i en països amb altes prevalences per l'HVH-8 representa un problema de salut pública. El SK es pot donar per reactivació en receptors HVH-8 seropositius, o per infecció a través de l'òrgan trasplantat en receptors seronegatius. En alguns casos s'ha pogut demostrar la presència de cèl·lules tumorals infectades per l'HVH-8 en el receptor que eren originàries del donant [Barozzi et al, 2003]. Per minimitzar la incidència de SK en aquests dos grups amb un risc més alt, seria convenient

determinar l'estat serològic tant del donant com del receptor abans del trasplantament utilitzant un assaig amb una alta especificitat. Cal tenir en compte, però, que la limitada disponibilitat d'assaigs comercialitzats per a aquesta finalitat dificulta el procés.

1.10. Tècniques serològiques per a la detecció de la infecció per l'HVH-8

Els mètodes serològics són, encara avui en dia, el mètode d'elecció per a la detecció de l'exposició al virus; són més sensibles que la PCR, especialment durant la latència. La resposta d'anticossos a la infecció per l'HVH-8 és detectable durant anys [Gao et al, 1996b]. La prevalença d'anticossos específics per l'HVH-8 és del 70-90% en tots els pacients amb SK i del 100% en pacients amb SK immunocompetents [Miller et al, 1996; Katano et al, 2000].

Des del descobriment de l'HVH-8 s'han desenvolupat una gran varietat de tècniques de laboratori per a detectar els anticossos enfront de l'HVH-8. A partir de diverses línies cel·lulars infectades pel virus derivades de pacients amb BCBL, es van obtenir els primers assaigs amb format d'immunofluorescència (IFA) i immunoblot. Depenent de l'estat induït o no dels cultius cel·lulars (vegeu punt 1.13), aquest assaig feia possible la detecció d'anticossos enfront d'antígens latents (principalment anti-LANA, amb un patró de tinció nuclear puntejat) o bé antígens lítics (tinció citoplasmàtica) [Lennette et al, 1996; Kedes et al, 1996; Moore et al, 1996; Miller et al, 1996; Gao et al, 1996a; Gao et al, 1996b; Smith et al, 1997; Chatlynne i Ablashi, 1999]. Els IFA basats en antígens lítics són més sensibles perquè poden detectar anticossos contra una gran varietat d'antígens (detecten el 100% dels pacients amb SK), però es creu que podrien ser poc específics, en obtenir-se seroprevalences en donants de

sang més altes que amb la resta de les tècniques [Lennette et al, 1996]. Per altra banda, els IFA basats en antígens latents només detecten el 70-80% dels pacients amb SK, però es creu que són més específics [Tedeschi et al, 2002]. Per aquest motiu s'han introduït modificacions que permeten augmentar l'especificitat dels IFA basats en antígens lítics, com són la incorporació d'un pas intermig d'incubació amb un anticòs monoclonal murí anti-IgG humana [Lennette et al, 1996] o l'augment de la dilució del sèrum. Darrerament també s'han desenvolupat línies cel·lulars no infectades per l'HVH-8 que expressen antígens vírics com a proteïnes recombinants [Inoue et al, 2000; Corchero et al, 2001].

La identificació de les proteïnes víriques més immunogèniques va donar lloc al desenvolupament d'una segona generació d'assaigs serològics. Aquestes proteïnes són: la proteïna LANA codificada per l'*orf* 73, una proteïna de la càpside codificada per l'*orf* 65 homòloga a la proteïna BFRF3 del VEB, i una glicoproteïna exclusiva de l'HVH-8 codificada per l'*orf* K8.1 [Chandran et al, 1998a]. A partir d'aquests antígens, bé obtinguts de manera recombinant o com a pèptids sintètics que reflecteixen els epítops més immunogènics, es van poder desenvolupar enzim-immunoassaigs (ELISA) i assaigs de *Western blot* [Simpson et al, 1996; Lin et al, 1997; Chatlynne et al, 1998; Pau et al, 1998; Raab et al, 1998; Chandran et al, 1998a; Spira et al, 2000]. Els ELISA basats en pèptids sintètics tenen una especificitat elevada però una menor sensibilitat, i per tant és convenient utilitzar diversos assaigs en paral·lel mitjançant algorismes serològics [Spira et al, 2000]. En el curs de la infecció per l'HVH-8, els anticossos enfront d'antígens lítics com el K8.1 o l'ORF65 apareixen abans que els anticossos enfront del principal antigen latent (LANA). En general, els assaigs basats en antígens latents són menys sensibles que els basats en antígens lítics, independentment de si es tracta d'un ELISA o d'un IFA [Corchero et al, 2001].

Tot i la gran diversitat d'assaigs desenvolupats, durant molts anys l'únic assaig comercialitzat ha estat un ELISA basat en un lisat víric obtingut a partir de la línia cel·lular KS-1 [Chatlynne et al, 1998]. Malgrat estar comercialitzat, aquest assaig no ha estat àmpliament utilitzat degut al seu elevat cost comparat amb les tècniques desenvolupades *in-house* en molts laboratoris, i a una sensibilitat relativament baixa [Spira et al, 2000], ja que detecta principalment anticossos enfront d'antígens vírics estructurals però no funciona tan bé en la detecció d'anticossos enfront d'antígens latents [Chatlynne i Ablashi, 1999].

1.11. Seroprevalença de la infecció per HVH-8

Les tècniques serològiques, a part de ser utilitzades per a estudiar la història natural de la infecció per l'HVH-8, predir el diagnòstic de SK, i avaluar possibles associacions d'aquest virus amb altres malalties, també han estat de gran utilitat per determinar la prevalença de la infecció en diverses poblacions.

Els estudis serològics realitzats fins avui en dia a nivell mundial suggereixen que actualment la infecció per l'HVH-8 és poc prevalent, a diferència de la majoria dels herpesvirus humans que són més ubics (el VEB, HCMV, VHS-1, VZV, HVH-6 i HVH-7 presenten seroprevalences de l'ordre del 70% a més del 95%). No obstant això, les estimacions de la prevalença de l'HVH-8 en poblacions sanes varien considerablement d'un estudi a un altre, especialment en poblacions de baix risc, degut a la utilització de diferents tècniques serològiques i diferents algoritmes. Generalment, les taxes de prevalença són més altes quan s'utilitzen assaigs basats en antígens lítics que en antígens latents [Chatlynne i Ablashi, 1999], i actualment es considera que la millor aproximació diagnòstica ha d'utilitzar una combinació dels dos tipus d'assaigs [Schatz et al, 2001]. En estudis multicèntrics la correlació entre diferents tècniques ha estat limitada [Rabkin et al, 1998;

Engels et al, 2000]. A causa d'aquesta falta de consens i que no existeix una tècnica que pugui ser utilitzada com a tècnica de referència, hi ha una certa confusió respecte la seroepidemiologia de l'HVH-8. Tanmateix, actualment els patrons de seroprevalença establerts a partir de diferents tècniques són similars (Figura 4). La majoria de grups d'investigació estan d'acord en que la seroprevalença de l'HVH-8 és més baixa al nord d'Europa i als EUA (0-5%), intermitja a Itàlia (5-35%) i Grècia (13-20%), i que les taxes més elevades es troben a l'Àfrica sub-Sahariana (30-60%) [Simpson et al, 1996; Kedes et al, 1996; Gao et al, 1996b; Mayama et al, 1998; Calabro et al, 1998; Schulz, 2000]. De fet, el SK és un dels càncers més comuns en la població general en regions de l'Àfrica central incloent-hi Uganda i Kènia [Wabinga et al, 1993]. A Espanya, la seroprevalença de l'HVH-8 en donants de sang és del 6.5% i, en concret, del 8% a Catalunya [Gambus et al, 2001].

1.12. Diagnòstic molecular de la infecció per l'HVH-8 i el SK

La sospita clínica de SK ve majoritàriament donda per la presència de lesions cutànies o mucoses típiques. Menys freqüentment, el SK pot afectar també el pulmó, estómac, intestí o vesícula biliar sense afectació de la pell. La confirmació del diagnòstic s'ha de fer mitjançant la biòpsia cutània en el cas d'afectació de la pell o mucoses, però requereix tècniques més complexes (broncoscòpia, endoscòpia, radiologia, ecografia, TAC o RM) en el cas d'afectació visceral. A partir de les biòpsies es pot realitzar un estudi histològic, en el qual s'observarà una proliferació en la dermis de les cèl·lules endotelials fusiformes típiques del SK, extravasació d'eritròcits, macròfags carregats d'hemosiderina i, en les fases primerenques, un infiltrat de cèl·lules inflamatòries. La detecció de l'HVH-8 en aquestes biòpsies per tècniques de biologia molecular poden complementar el diagnòstic. Per altra banda, les lesions de SK poden tenir una aparença similar a la d'altres processos cutanis, tant inflamatoris com neoplàsics. Pot ser especialment

difícil distingir-lo de l'angiomatosi bacil·lar (infecció crònica per *Bartonella quintana* o *Bartonella henselae* freqüent en pacients VIH positius), el pseudo-Sarcoma de Kaposi (alteració vascular benigna per insuficiència venosa) i el dermatofibroma (tumor benigne fibrós subepidèrmic), i per tant s'han de plantejar en el diagnòstic diferencial [Esteve et al, 2002]. L'afectació del tracte gastrointestinal és generalment asimptomàtica i per tant pot ser difícil de diagnosticar. L'afectació pulmonar també pot ser difícil de diagnosticar radiològicament i, a més a més, té un pronòstic dolent. Cal recordar que el SK pot presentar-se en combinació amb la MCD en els ganglis limfàtics o amb el PEL en les cavitats visceral, presentant una clínica complexa [Moore i Chang, 2002].

Les tècniques d'amplificació d'àcids nucleics s'han utilitzat per demostrar l'associació entre l'HVH-8 i diverses malalties, així com per estudiar els mecanismes de transmissió del virus. Per altra banda, aquestes tècniques també podrien tenir valor a nivell clínic. La detecció i quantificació del genoma víric en sang perifèrica ha estat proposat com a marcador de la replicació i la reactivació, i s'utilitza habitualment en el diagnòstic i monitoratge de diverses infeccions víriques. Alguns estudis han demostrat que la detecció del genoma de l'HVH-8 en PBMC en pacients VIH-positius està relacionada amb un augment del risc de desenvolupar SK i amb l'estadiatge d'aquesta malaltia [Ambroziak et al, 1995; Whitby et al, 1995; Gao et al, 1996b; Cannon et al, 2003; Engels et al, 2003]. Tot i que la correlació amb l'estadi del SK no sempre ha estat observada [Boivin et al, 2000], s'ha descrit que els limfòcits B circulants podrien servir com a reservori de virus capaç de replicar-se activament [Decker et al, 1996; Grandadam et al, 1997], i per tant l'avaluació de la virèmia en la infecció per l'HVH-8 podria tenir una rellevància clínica. Tanmateix, mentre la PCR en biòpsies de lesions de SK és positiva en més d'un 95% dels casos [Moore i Chang, 1995], la taxa de detecció de DNA víric en PBMC de pacients amb SK associat a la sida (i que per tant estan infectats per l'HVH-8) en l'era de la HAART varia entre el 30 i el 70% a Amèrica i Europa [Min i Katzenstein,

1999; Boivin et al, 1999; Campbell et al, 1999; Boivin et al, 2000; Boivin et al, 2002; Cannon et al, 2003].

Actualment es desconeix el motiu d'aquesta baixa detecció. Les causes podrien ser que i) la tècnica de PCR no fos suficientment sensible, ii) la freqüència de cèl·lules infectades fos menor a l'observada per altres herpesvirus humans com per exemple el VEB, i per tant la probabilitat de detectar el genoma en l'alíquota utilitzada en la PCR fos molt baixa o iii) el virus no es trobés circulant en la sang de manera contínua; és possible que només sigui detectable en sang durant la infecció aguda i la reactivació en la infecció crònica.

Des del descobriment de l'HVH-8 s'han desenvolupat diverses reaccions de PCR *in-house* [Tedeschi et al, 2002]. No obstant això, s'ha de tenir en compte que moltes d'aquestes tècniques poden haver estat afectades per la presència de reaccions falsament negatives, degut al tipus de mostra utilitzada, l'eficiència de les tècniques d'extracció de DNA, la presència d'inhibidors de la PCR, i la pròpia reacció segons el parell de *primers* utilitzats. És de gran importància disposar d'un control intern en cada reacció per descartar els falsos negatius. Per altra banda, la presència de falsos positius és un desavantatge àmpliament conegut de la PCR. En aquest sentit, la utilització de mètodes bioquímics per a la destrucció dels possibles amplicons contaminants en un pas previ a la PCR, com és la utilització d'uracil enlloc de timina juntament amb l'enzim uracil-N-glicosilasa, ha suposat un gran avenç [Pellett et al, 1999].

És necessària, per tant, la utilització de tècniques rigorosament validades per a obtenir una determinació quantitativa acurada de la càrrega vírica de l'HVH-8 en sang i, a partir d'aquí, estudiar amb més detall la seva correlació amb diferents condicions clíniques i factors de risc, així com per guanyar informació sobre la possibilitat de transmissió d'aquest virus a través de transfusions sanguínies.

1.13. Sistemes experimentals per a l'estudi de la biologia de l'HVH-8

En el cultiu *in vitro* de les cèl·lules fusiformes obtingudes a partir de biòpsies de lesions de SK, el genoma víric acaba perdent-se completament després de diversos passatges [Dourmishev et al, 2003]. Aquest fet suggereix la importància de factors locals com les citoquines inflamatòries presents en les lesions de SK en el manteniment de les cèl·lules infectades.

Per altra banda, s'han obtingut diverses línies cel·lulars derivades del BCBL que han estat crucials per a l'estudi de la biologia del virus [Drexler et al, 1998]. Aquestes línies cel·lulars estan transformades i no expressen la majoria de marcadors típics dels limfòcits B, però mantenen una infecció continuada per l'HVH-8 retenint-lo en forma d'episoma amb 30-150 còpies per cèl·lula [Sarid et al, 1999]. Mentre la majoria de les cèl·lules presenten una infecció latent, la replicació lítica s'indueix de manera espontània en un petit percentatge de les cèl·lules. El tractament amb 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetat (TPA) [Moore et al, 1996] o *n*-butirat [Miller et al, 1997] permet induir la replicació lítica en un percentatge més alt de les cèl·lules, depenent de la durada i les condicions de l'estimulació [Renne et al, 1996]. Aquestes línies cel·lulars han servit com a font d'antígens de l'HVH-8 per al desenvolupament dels assaigs serològics.

Mentre aquesta via d'estudi de l'HVH-8 ha estat convenient i ha aportat molts coneixements, el BCBL és una conseqüència poc freqüent de la infecció per aquest virus, i és molt probable que hi hagi diferències importants entre la biologia del virus en aquestes cèl·lules i *in vivo* en individus infectats.

Per altra banda, en estar ja infectades, les línies derivades del BCBL no permeten l'estudi de l'entrada del virus a la cèl·lula. Diverses línies

cel·lulars i cèl·lules primàries de múltiples orígens histològics s'han utilitzat per realitzar estudis de tropisme, i s'ha vist que l'HVH-8 té un reduït espectre de cèl·lules hoste en cultiu, si bé s'uneix ràpidament als limfòcits B i els monòcits de sang perifèrica [Foreman et al, 1997; Renne et al, 1998; Blackburn et al, 2000]. S'han utilitzat també línies cel·lulars endotelials, a partir de les quals s'han obtingut evidències del potencial transformador de l'HVH-8 [Flore et al, 1998], i s'han estudiat els efectes de la infecció sobre patró d'expressió gènica cel·lular per microarrays [Moses et al, 2002]. No obstant això, la immensa majoria de cèl·lules cultivades *in vitro* no permeten la infecció productiva ni la infecció latent a llarg termini.

S'han obtingut models de patogènesi en ratolins immunodeprimits a través del trasplantament de teixit humà. Amb la injecció de cèl·lules BCBL-1 en ratolins amb immunodeficiència severa combinada (SCID/hu) s'han obtingut limfomes tipus MCD [Picchio et al, 1997], i en ratolins diabètics no obesos (NOD/SCID) s'han observat efusions similars al PEL [Boshoff et al, 1998]. Per últim, del trasplantament de pell humana (queratomes) en sis de vuit ratolins SCID/hu van resultar lesions similars a les del SK [Foreman et al, 2001]. Tot i això, el virus es manté en el teixit humà i no infecta les cèl·lules murines, demostrant una estricta barrera entre espècies.

S'està treballant també amb l'HV γ 68, patògen murí, com a model de patogènesi dels gamma-herpesvirus [Simas i Efstathiou, 1998], però no existeix en l'actualitat cap model animal que permeti l'estudi de la latència i la patogènesi de l'HVH-8 *in vivo*.

Davant d'aquests múltiples obstacles tècnics, es fa palès que les tècniques de biologia molecular són un recurs molt important a l'hora d'estudiar agents infecciosos no cultivables. Per altra banda, és indispensable estudiar el comportament del virus en el seu hoste natural tot i que, a diferència dels models animals, no hi hagi la possibilitat de controlar factors tan importants com el moment de la infecció, i ofereixin un gran

nombre de dificultats tècniques, com per exemple el reclutament de pacients, o la limitació en el volum de les mostres clíniques. És el sistema experimental més important i biològicament rellevant, l'ésser humà, el que hem escollit per desenvolupar aquest treball de recerca.

2. OBJECTIUS

2.1. Justificació de la unitat temàtica de la tesi

Des del descobriment relativament recent de l'HVH-8 el 1994, s'ha après molt sobre la biologia del virus, la seva associació etiopatogènica amb diverses neoplàsies i altres malalties, així com de la seva distribució mundial. No obstant això, a mesura que s'aprofunditza en el coneixement sobre l'HVH-8, i en veure com es diferencia dels altres membres de la mateixa família, es fa palès que queden molts aspectes per conèixer.

Amb aquesta tesi ens hem proposat respondre dues grans preguntes pel que fa a la detecció de la infecció per l'HVH-8 a partir de mostres de sang: quin és l'abast de la infecció per l'HVH-8 a nivell de la població general, especialment en les dues primeres dècades de vida –a través de proves serològiques–, i quin és l'abast de la virèmia a nivell de població de risc per al desenvolupament del SK i pacients amb la malaltia –a través de la detecció del propi virus–. L'estudi d'aquests dos paràmetres ens porta a aprofundir en l'estudi de la infecció i la patogènia de la infecció per l'HVH-8.

En els últims 10 anys s'han desenvolupat diversos assaigs serològics. Es tracta d'assaigs casolans poc estandarditzats, que es basen en dos tipus d'antígens molt diferents; els assaigs basats en antígens lítics poden donar lloc a falsos positius a través de reaccions inespecífiques, mentre que els basats en antígens latents poden subestimar la seroprevalença (no tots els individus infectats desenvolupen una resposta serològica detectable enfront d'aquests antígens). Aquest fet ha donat lloc a una intensa controvèrsia sobre la seroepidemiologia de la infecció per l'HVH-8. Mentre existeixen nombroses evidències que el virus es transmet per via sexual entre MSM en països no endèmics, la prevalença de la infecció en la població infantil i adolescent en aquestes zones és pràcticament desconeguda. Pocs estudis s'han centrat en

aquesta població, els tamanyos de mostra utilitzats han estat relativament petits, i els assaigs serològics poc sensibles en poblacions de baix risc. Per això es creu que la població infantil és bàsicament negativa per l'HVH-8 en els països occidentals i es desconeix l'edat en la qual té lloc la infecció primària. Per tant, era necessària la realització d'un estudi (Article I) que permetés caracteritzar la taxa d'infecció i les rutes de transmissió de l'HVH-8 en el grup de població que encara no ha arribat a la maduresa sexual. Per tal de respondre les qüestions plantejades l'estudi havia de tenir les següents característiques: (i) incloure una població infantil-adolescent prou gran, (ii) utilitzar assaigs serològics prou sensibles i específics per poder determinar la presència o absència de la infecció per l'HVH-8 en aquesta població, (iii) comparar la prevalença de la infecció per l'HVH-8 entre zones endèmiques i no endèmiques per l'HVH-8 i, per últim, (iv) analitzar la tendència d'aquesta seroprevalença amb l'edat en comparació del virus filogenèticament més proper i de transmissió horitzontal, el VEB.

Pel que fa a la detecció del genoma de l'HVH-8 en relació a la patogènia del SK, existeix l'assumpció de que la prevalença del virus a la sang és baixa (al voltant d'un 50%, fins i tot en pacients amb SK). Aquesta assumpció, iniciada a partir dels primers estudis que van utilitzar reaccions de PCR qualitatives, va continuar tot i el desenvolupament de reaccions quantitatives. Ningú no s'havia plantejat descriure amb detall les característiques de la virèmia per aclarir quines són les causes d'aquesta baixa detecció. Pel que fa al paper de la virèmia en la patogènia del SK, hi ha grans preguntes que només estan parcialment respostes: es desconeix si el virus circulat en sang perifèrica representa una infecció lítica o latent; quina és la proporció de cèl·lules sanguínies infectades lítica i latentment; si les cèl·lules circulants poden actuar com a font de virus que doni lloc a la infecció d'altres teixits o si aquestes s'infecten en circular a través de les lesions del SK; i sobretot, si en pacients de SK o individus HVH-8 seropositius que són PCR negatius en sang, la càrrega vírica es troba per sota del nivell de detecció de les tècniques moleculars o el virus està realment absent. En l'Article II ens vam plantejar si el fet que l'HVH-8 sigui poc prevalent en sang és a causa de limitacions metodològiques o no i, al

mateix temps, vam voler aprofundir en la biologia de la infecció i la patogènia de l'HVH-8. Per donar una resposta a aquestes qüestions calia desenvolupar un mètode que no només permetés estudiar la càrrega vírica de l'HVH-8 en sang, sinó també establir quina és la freqüència de cèl·lules sanguínies infectades en un determinat volum de sang, així com el nombre de genomes vírics per cèl·lula infectada.

2.2. Objectius plantejats

2.2.1. Caracterització de la taxa d'infecció i rutes de transmissió de l' HVH-8 en nens i adolescents, en comparació del VEB (Article I)

- Determinar la taxa de seroprevalença de l'HVH-8 en dues poblacions de nens i adolescents de zones no endèmiques (EUA i Alemanya) en comparació amb una zona endèmica (Nigèria).
- Avaluat quin de tres mètodes serològics és millor per al diagnòstic de la infecció per l'HVH-8 en la població infantil i adolescent.
- Valorar si existeixen evidències de transmissió horitzontal, és a dir, si la seroprevalença augmenta amb l'edat, en l'etapa prèvia a la maduresa sexual, comparant el patró de seroprevalença respecte l'edat de l'HVH-8 amb el del VEB (l'herpesvirus més estretament relacionat i transmès horitzontalment).

2.2.2. Caracterització de la virèmia en la infecció per l'HVH-8 i del seu paper en la patogènia del SK (Article II)

- Desenvolupar un mètode que permeti descriure quantitativament la virèmia en la infecció per l'HVH-8.
- Obtenir una determinació acurada dels valors de la càrrega vírica en PBMC de pacients de SK i pacients d'alt risc.
- Determinar la freqüència de PBMC infectades per l'HVH-8, així com el nombre de genomes vírics per cèl·lula infectada, en els pacients PCR positius.
- Establir si la càrrega vírica en sang i/o la freqüència de cèl·lules infectades manté alguna relació amb la presència de lesions SK.
- Establir si la càrrega vírica es troba per sota el límit de detecció o si el virus és veritablement absent en individus que essent HVH-8 seropositius o fins i tot tenint SK tenen resultats de PCR negatius en PBMC.
- Determinar si el virus present en les PBMC representa infecció lítica o latent, i la seva possible implicació en la patogènia del SK.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Caracterització de la taxa d'infecció i rutes de transmissió de l'HVH-8 en nens i adolescents, en comparació del VEB (Article I)

Les vies de transmissió i l'edat en la qual té lloc la infecció primària per HVH-8 en àrees on el SK no és endèmic no han estat gaire estudiades. A EUA i Europa, els estudis que han inclòs nens són limitats, i el nombre de mostres avaluades en aquests estudis ha estat relativament baix [Lennette et al, 1996; Blauvelt et al, 1997; Chandran et al, 1998a; Chandran et al, 1998b]. A l'igual que el VEB, l'HVH-8 es pot trobar en les secrecions orals [Koelle et al, 1997; Cannon et al, 2003] i en països de l'Àfrica central, on la prevalença d'aquest virus és més elevada, s'observa que la seroprevalença augmenta amb l'edat abans d'arribar a la pubertat, indicant l'existència d'una via de transmissió horitzontal per aquest virus [Bourboulia et al, 1998; Mayama et al, 1998; Andreoni et al, 1999; Plancoulaine et al, 2000].

Per aclarir si l'HVH-8 es pot adquirir per via horitzontal en àrees no endèmiques pel virus, a part de la coneguda ruta de transmissió sexual sobretot observada entre MSM, ens vam plantejar de realitzar una anàlisi exhaustiva de la seroprevalença d'aquesta infecció en nens i adolescents d'EUA i Alemanya, en comparació amb una zona endèmica (Plateau State, Nigèria). En aquest estudi vam emprar un nombre de mostres relativament elevat (n=971), juntament amb assaigs serològics prou sensibles i específics. Paral·lelament, vam avaluar la presència d'anticossos enfront del VEB en les mateixes mostres, per tal d'establir si hi havia algun tipus de relació entre la infecció per aquests dos virus estretament relacionats.

Es tracta doncs d'un estudi transversal de tres poblacions; 552 nens i adolescents de 6 mesos a 17 anys que havien acudit als hospitals de

Geòrgia, EUA per malaltia o seguiment rutinari; 235 individus amb el mateix rang d'edats residents al nord d'Alemanya també vistos a hospitals; i 184 nens de la comunitat de 6 a 38 mesos d'edat residents a Jos, Plateau State, Nigèria. Aquests últims van ser reclutats durant un estudi aleatoritzat en el qual no es van seleccionar més de dos infants per habitatge.

Per determinar la seroprevalença de l'HVH-8 vam utilitzar un algoritme que combina tres assaigs serològics per a la detecció d'anticossos específics enfront dels tres antígens més immunogènics [Tedeschi et al, 2002]: l'antigen latent majoritari (LANA), l'ORF65 i el K8.1. El primer assaig és un IFA que utilitza cèl·lules BCBL-1 induïdes amb TPA [Lennette et al, 1996]. Aquest assaig permet la detecció tant d'anticossos enfront del LANA (tinció nuclear puntuada) com d'aquells enfront d'una gran varietat d'antígens lítics expressats per un percentatge –del 10 al 30%– de les cèl·lules (tinció citoplasmàtica). Per dur a terme aquest assaig, però, es va utilitzar una dilució 1:40 de les mostres de sèrum per tal d'evitar reaccions inespecífiques. Per altra banda, vam utilitzar assaigs tipus ELISA basats en pèptids de proteïnes antigèniques expressades durant el cicle lític; la proteïna K8.1 és única per l'HVH-8, mentre la proteïna ORF65 és homòloga a la proteïna BFRF3 del VEB. No obstant això, el pèptid derivat de l'ORF65 utilitzat per recobrir les plaques d'ELISA només té tres aminoàcids iguals a la seva proteïna homòloga en el VEB [Pau et al, 1998; Spira et al, 2000]. Aquests dos assaigs van demostrar posseir una elevada sensibilitat i especificitat a l'hora de detectar la infecció per l'HVH-8 [Spira et al, 2000]. S'ha descrit que l'aparició dels anticossos enfront d'aquests dos antígens lítics precedeix l'aparició dels anticossos enfront de l'antigen latent LANA [Tedeschi et al, 2002].

3.1.1. Seroprevalença de l'HVH-8

Tal com es pot observar en la Taula 1 (Article I), les taxes de seroprevalença per l'HVH-8 van ser baixes en tots els grups d'edat entre els

6 mesos i els 17 anys, tant a Geòrgia (EUA) com a Alemanya. En la primera regió la prevalença de la infecció per l'HVH-8 va variar entre un 0 i un 6% (mitja, 4%). En la segona regió la seroprevalença va variar entre el 0 i el 8% (mitja, 3%). En cap dels dos casos es van poder observar tendències de la seroprevalença amb l'edat (test de tendència de Cochran-Armitage, $p=0.82$ i $p=0.23$, respectivament); val a dir que amb el baix nombre d'individus seropositius obtingut per grup d'edat només hauria estat possible observar alguna tendència si aquesta hagués estat molt marcada. Els valors obtinguts en els nens nord-americans són similars als observats en donants de sang en aquest país (2.4%) utilitzant els mateixos mètodes serològics [Pellett et al, 2003]. Cal tenir en compte que els donants de sang constitueixen un grup que ha passat un cribratge serològic i de conductes de risc, i que per tant, la seroprevalença en la població general podria ser més elevada. Estudis anteriors en aquest país havien obtingut valors del 5% en donants de sang [Simpson et al, 1996] i del 8% [Chandran et al, 1998a] en adults sans. A Alemanya no s'ha realitzat cap estudi que inclogui població infantil, però la seroprevalença en donants de sang està entre el 4 i l'11% segons l'assaig serològic utilitzat [Raab et al, 1998].

En nens de 6 a 38 mesos de Nigèria, la seroprevalença (14%) va ser significativament superior a l'observada en nens nord-americans (6%, $p=0.05$) i alemanys (4%, $p=0.024$) de la mateixa edat, tal i com esperàvem. Nigèria és un país endèmic per l'HVH-8 i el SK representa fins el 15-20% dels tumors malignes en determinades regions [Ziegler, 1993]. A més a més, es va observar una tendència de la seroprevalença a augmentar amb l'edat fins els 38 mesos ($p=0.067$), d'acord amb estudis anteriors [Kasolo et al, 1997; Bourboulia et al, 1998; Mayama et al, 1998; Gessain et al, 1999; Andreoni et al, 1999]. No obstant això, aquesta taxa de seroprevalença en l'últim grup d'edat estudiat va ser menor que l'observada en la població adulta de Nigèria (56%) [Lennette et al, 1996]. Aquests resultats indiquen que si bé l'HVH-8 pot transmetre's horitzontalment durant la infància, altres vies de transmissió poden també contribuir a l'elevada seroprevalença

observada després de l'adolescència, com la ruta de transmissió sexual. Tot i això, en un estudi es va trobar una forta correlació entre la seroprevalença de l'HVH-8 entre germans i entre mare i fill però no dins la parella, i la seroprevalença augmentava fins els 15 anys però es mantenia estable durant el rang d'edat amb major activitat sexual [Plancoulaine et al, 2000].

En el grup de nens americans es va detectar una tendència dels títols d'anticossos enfront de l'HVH-8 a disminuir amb l'edat. Aquest resultat podria indicar que, per terme mig, hi ha més infeccions entre els nens de menys de cinc anys d'edat. Estudis longitudinals han demostrat que el títol d'anticossos enfront d'aquest virus és màxim dins el primer any després de la detecció del seu genoma en sang i, posteriorment, els títols disminueixen fins a assolir nivells baixos en la majoria d'individus en uns 2-3 anys [Wang et al, 2001]. Per tant, els anticossos enfront de l'HVH-8 poden no persistir a llarg termini en poblacions que estan poc exposades al virus, com en zones no endèmiques.

La informació referent al gènere només era disponible en el grup dels EUA. El fet de no trobar diferències significatives entre la seroprevalença observada en nens i nenes (5% i 3%, respectivament) concorda amb altres estudis realitzats també en adults [Plancoulaine et al, 2000; Plancoulaine et al, 2002], i contrasta amb la diferent distribució de la incidència de SK; la relació home:dona varia de 3:1 a la conca del Mediterrani fins a 15:1 al centre d'Àfrica [Plancoulaine et al, 2002]. Aquest fet reflexa la importància tant de cofactors com de factors protectors com la hormona femenina gonadotropina coriònica en la patogènia del SK [Hermans et al, 1998].

És important destacar que entre els 787 nens i adolescents de poblacions no endèmiques per l'HVH-8 inclosos en l'estudi, aquells que van resultar positius van ser identificats com a tals per la tècnica d'IFA, mentre van ser negatius per les altres tècniques. Només un dels 28 casos va ser positiu pels dos ELISA basats en pèptids i negatiu en l'IFA. En un estudi

multicèntric recent, es van comparar els resultats obtinguts en diversos laboratoris dels EUA que utilitzaven diferents assaigs i algorismes serològics a l'hora de determinar la seroprevalença en un grup de pacients de SK i un grup de donants de sang [Pellett et al, 2003]. Mentre la concordança va ser molt elevada en el grup corresponent a SK (tots els centres participants van obtenir un 100% de positius), la seroprevalença en donants de sang va variar entre un 0.5% i un 5.1% segons el laboratori. Aquests resultats demostren que, en utilitzar algorismes, la variabilitat entre laboratoris ha disminuït respecte estudis multicèntrics anteriors [Rabkin et al, 1998; Corchero et al, 2001] però, tot i això, l'estratègia serològica utilitzada continua essent un factor de variabilitat important a l'hora de detectar la infecció per l'HVH-8.

De la mateixa manera, els estudis realitzats fins ara en nens en zones no endèmiques, han donat resultats variables. Lennette *et al.*, utilitzant un test d'IFA per a la detecció d'anticossos enfront d'antígens lítics, va trobar una seroprevalença del 2 al 8% en analitzar 262 nens de 6 mesos a 15 anys d'edat als EUA [Lennette et al, 1996]. No obstant això, utilitzant el mateix test serològic van estimar una seroprevalença del 25% en adults sans. Diversos autors han criticat aquest mètode per una falta d'especificitat [Tedeschi et al, 2002], que podria venir donada per la baixa dilució de sèrum utilitzada (1:10). En aquest estudi vam determinar que la dilució òptima era de 1:40. Per altra banda, en un estudi amb 51 nens de 6 mesos a 18 anys amb sida Blauvelt *et al.* no van detectar cap seropositiu. Basant-se en que la majoria d'infeccions per herpesvirus són més fàcilment detectables en individus immunocompromesos, conclouien que a EUA la infecció primària per l'HVH-8 en la població general havia de tenir lloc després de l'adolescència [Blauvelt et al, 1997]. En l'estudi anomenat es va utilitzar un IFA per a la detecció d'anticossos enfront d'antígens latents amb una dilució de sèrum de 1:200, i un test d'ELISA basat en l'antigen ORF65 recombinant. Cal tenir en compte, però, que diversos estudis han demostrat que l'IFA basat en cèl·lules latentment infectades per l'HVH-8 presenta una

menor sensibilitat que el basat en cèl·lules induïdes al cicle lític [Rabkin et al, 1998; Spira et al, 2000; Corchero et al, 2001]. Per altra banda, segons el nostre estudi i altres, els ELISA basats en un sol pèptid antigènic pertanyent a una proteïna expressada durant el cicle lític poden no ser suficientment sensibles per a l'estudi de la prevalença en la població de baix risc, ja que només detecten aquells anticossos dirigits enfront d'una petita part de la proteïna antigènica mentre poden existir altres epítops importants, i a més a més aquests assaigs no permeten detectar les infeccions latents [Spira et al, 2000; Tedeschi et al, 2002]. Finalment, Chandran *et al.* no van trobar cap nen seropositiu en un estudi en nens sans entre un i cinc anys d'edat, en utilitzar un IFA per anticossos enfront d'antígens lítics (n=110) i un *western blot* utilitzant l'antigen K8.1 (n=48) [Chandran et al, 1998a; Chandran et al, 1998b]. Tot i que aquests assaigs són similars als que nosaltres vam utilitzar, en el nostre estudi les mostres de sèrum provenien de nens que havien acudit a clíniques i hospitals per causes diverses, i no podem descartar que aquests nens tinguessin una prevalença per l'HVH-8 més alta que els nens sans.

És evident, doncs, que és necessària la utilització d'assaigs enfront de diversos epítops vírics per tal d'assolir una màxima sensibilitat i aconseguir determinar la seroprevalença veritable de la infecció per l'HVH-8, sobretot en àrees no endèmiques, ja que la resposta d'anticossos enfront dels diferents antígens vírics pot variar d'un individu a un altre [Biggar et al, 2003; Laney et al, 2004] i, per tant, és molt important utilitzar assaigs serològics amb diversos antígens. Com ja s'ha descrit anteriorment, en el nostre estudi hem utilitzat un algoritme que combina tres assaigs serològics per a la detecció d'anticossos enfront de diversos antígens vírics tant lítics com latents. La utilització d'aquest algoritme va permetre doncs obtenir una estimació precisa de les taxes de seroprevalença.

Cal destacar que en la població estudiada de Plateau State, Nigèria, la concordança entre els tres assaigs serològics utilitzats va ser més elevada:

set dels 25 seropositius tenien anticossos enfront dels dos pèptids utilitzats en els ELISA, i sis d'aquests eren també positius en l'IFA. Aquests resultats podrien indicar que a Nigèria, un país endèmic pel SK, hi ha una exposició més gran al virus i, per tant, una resposta immunològica més completa, incloent-hi el desenvolupament d'anticossos enfront dels pèptids derivats dels antigens ORF65 i K8.1. En aquesta població l'IFA va ser també l'assaig amb una reactivitat més alta (25/25) i a més a més, 14/25 van ser positius només en l'IFA.

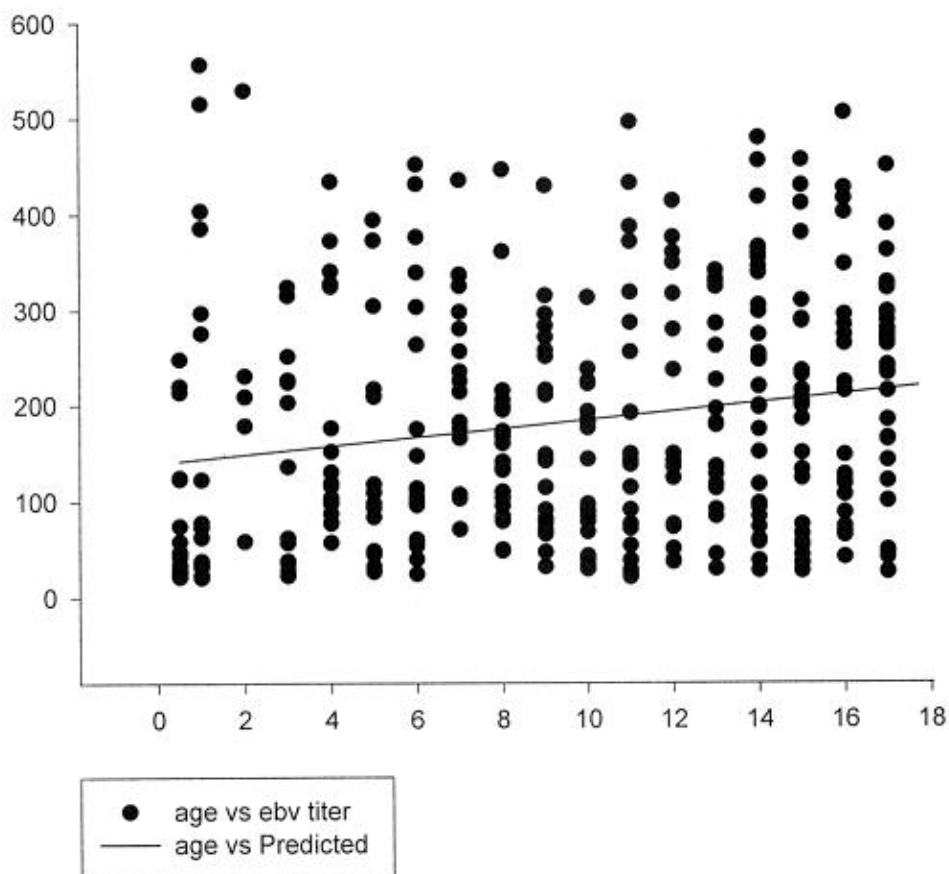
En conclusió, la tècnica d'IFA és la que permet una millor detecció dels anticossos anti-HVH-8 per a diagnosticar la infecció per aquest virus en la població infantil i adolescent, tant en zones endèmiques com no endèmiques. No obstant això, cal tenir en compte que en poblacions amb baix risc d'infecció i, per tant, baixa seroprevalença, el valor predictiu positiu dels assaigs serològics és baix [Engels et al, 2000]. És important, doncs, determinar els títols dels anticossos per assegurar que els resultats positius obtinguts ho siguin veritablement. Entre les mostres de sèrum incloses en l'estudi, el títol va variar entre 1:40 i 1:1280; es van avaluar els sèrums per duplicat en dos lots de preparacions diferents (preparades a partir de dos cultius diferents de cèl·lules BCBL-1 induïdes amb TPA); i dues persones experimentades en la lectura d'aquest tipus d'assaig van coincidir en els resultats.

3.1.2. Seroprevalença del VEB

Entre els nens d'Alemanya (de 6 mesos a 17 anys), un 61% van ser positius per la IgG enfront de l'antigen de la càpside vírica (VCA) del VEB. De manera similar, el 64% de les mostres d'EUA van ser seropositives per al VEB. Les diferències entre nens i nenes no van arribar a ser significatives (67 vs. 60%, $p=0.08$) però sí que es va observar una tendència creixent de la seroprevalença amb l'edat (test de tendència de Cochran-Armitage,

$p < 0.001$), tal com esperàvem, evidenciant la presència de transmissió horitzontal en aquesta població. Per altra banda, la mitjana geomètrica dels títols d'IgG enfront del VCA, calculats a partir de l'ELISA semi-quantitatiu, també va presentar una tendència creixent significativa amb l'edat (Figura 5). Aquests resultats concorden amb els d'un estudi en el qual es van avaluar els títols de manera longitudinal en nens [Chan et al, 2001].

Figura 5. Tendència significativament creixent amb l'edat (en anys, eix X) de la mitjana geomètrica dels títols d'IgG enfront del VCA (eix Y, unitats arbitràries en l'ELISA semiquantitatiu). En l'anàlisi de regressió linial, el pendent de la línia de regressió és significativament diferent de 0 ($p < 0.001$); els títols augmenten en 4.4 unitats arbitràries de densitat òptica per any d'edat.



El 88% dels nens de Nigèria de 6 a 38 mesos van ser VEB seropositius. Tal i com era d'esperar, la seroprevalença en aquest grup va ser significativament més alta a l'observada en infants d'EUA (45%) i

d'Alemanya (35%) de la mateixa edat ($p < 0.001$ en ambdós casos). En zones d'estatus social i econòmic més baix on les mesures higièniques són més limitades i el nombre de nens vivint junts per unitat familiar és alt, la infecció primària pel VEB té lloc majoritàriament durant la infància i més d'un 90% són seropositius ja a l'edat de quatre anys, mentre que en països industrialitzats en molts casos la infecció es pot retardar fins a l'adolescència i la joventut [Jenson, 2002]. Per altra banda, els nens de Nigèria van mostrar una proporció més alta (39%) de títols elevats en l'IFA ($> 1:10240$) en comparació a EUA (3%) i Alemanya (0%), característics de la infecció aguda.

Un percentatge relativament elevat (71%) dels infants de 6 a 11 mesos dels EUA va resultar positiu per l'IgG anti VCA en relació al següent grup d'edat (Figura 2, Article I), i ens vam plantejar si aquest resultat estava indicant una alta proporció d'infecció primària en els primers mesos de vida, o la persistència dels anticossos d'origen matern més enllà dels primers 6 mesos de vida. Per discriminar si es tractava d'una infecció aguda en el propi infant o d'una infecció passada (indicadora de la presència d'anticòs matern transplacentari) vam determinar la presència d'IgM anti VCA i d'IgG anti antigen nuclear (EBNA) en les mostres positives per IgG anti VCA. Només un 6% (1/17) dels infants d'aquest grup van ser positius per la IgM anti VCA, indicadora d'infecció aguda pel VEB. S'ha de tenir en compte, però, que la presència d'IgM en sèrum és relativament curta (al voltant de quatre setmanes) en nens amb una edat inferior als quatre anys [Jenson, 2002] i això dificulta la seva detecció en un estudi transversal com el nostre. No obstant això, cal fer palès que la majoria dels nens (13/17, 76%) tenien densitats òptiques corresponents a positius dèbils en l'ELISA semiquantitatiu per l'IgG anti VCA, mentre que si es tractés d'una infecció primària, caldria esperar títols elevats d'aquest anticòs. Per altra banda, un 41% (7/17) van ser positius per la IgG anti EBNA, indicadora d'infecció passada en la mare. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'elevat percentatge de seropositivitat per al VEB en nens de 6 a 11 mesos va ser degut, en gran

part, a la presència d'anticossos anti VCA d'origen matern en el sèrum d'aquests nens. En estudiar la transferència d'anticossos enfront de diversos herpesvirus, es va demostrar que els anticossos d'origen matern presents en la sang de cordó umbilical mostren títols similars als observats en el sèrum de la mare [Gotlieb-Stematsky et al, 1983]. En un estudi realitzat a Ghana es van detectar anticossos materns en infants de fins a set mesos d'edat [Biggar et al, 1978], i fins a 14 mesos en un estudi a Taiwan [Huang et al, 1993]. Els nostres resultats concorden amb els obtinguts per Fleisher *et al.* en nens d'EUA de 3 a 12 mesos, on només un petit percentatge (3/42, 7%) va mostrar evidències serològiques d'infecció aguda o recent pel VEB [Fleisher et al, 1979]. De fet, la presència d'anticossos materns protegeix els nadons de la infecció durant aproximadament els primers vuit mesos de vida [Chan et al, 2001].

Per tant, la inclusió de la determinació d'anticossos enfront del VEB en aquest estudi, i poder comprovar que la seroprevalença del VEB augmentava amb l'edat, tal i com era d'esperar per a un virus de transmissió horitzontal, ens ha permès validar els resultats obtinguts per l'HVH-8 en les mateixes mostres de sèrum. Així mateix, tal i com es descriu a continuació ens ha estat possible estudiar la relació a nivell d'infecció per aquests dos virus.

3.1.3. Relació entre l'HVH-8 i el VEB a nivell serològic

Degut a l'estreta relació filogenètica entre els dos gammaherpesvirus humans, l'HVH-8 i el VEB, i l'alt grau d'homologia entre moltes de les seves proteïnes, diversos investigadors s'han plantejat d'estudiar la possibilitat d'obtenir reactivitats creuades a l'hora d'utilitzar tests serològics per a la detecció de la infecció per l'HVH-8. Per descartar aquesta possibilitat, ens vam centrar en la regió de Nigèria, on els títols d'anticossos enfront del VEB eren més elevats, i per tant hi havia més possibilitats d'obtenir reaccions

creuades, i vam estudiar la seropositivitat per l'HVH-8 en funció dels títols d'anticossos enfront del VEB. Tal i com es pot veure en la Taula 1, la taxa de seroprevalença per l'HVH-8 no va augmentar amb el títol d'anticossos enfront del VEB. Per altra banda, en realitzar un estudi de regressió lineal entre els títols d'anticossos enfront dels dos virus, la correlació entre aquestes dues variables no va resultar significativa en cap de les tres regions geogràfiques estudiades (Figura 3, Article I).

Taula 1. Variació de la taxa de seropositivitat per l'HVH-8 en funció del títol d'anticossos enfront del VEB a Nigèria.

Títol d'anticossos enfront del VEB	Taxa de seropositivitat per l'HVH-8 (%)
Seronegatiu	13
1:40 – 1:1280	20
1:2560 – 1:5120	14
≥ 1:10240	13

Per tant, podem concloure que els resultats obtinguts per a la seroprevalença de l'HVH-8 no van ser deguts a la reactivitat creuada entre els anticossos anti VEB i els antígens derivats de l'HVH-8 utilitzats en els assaigs serològics. Anteriorment, també s'havia descartat aquesta possibilitat en dos estudis independents [Lennette et al, 1996; Corchero et al, 2001].

El nostre estudi, el més ampli realitzat en nens de zones no endèmiques per l'HVH-8, demostra que la infecció per via horitzontal durant la infància i l'adolescència també té lloc, tot i que a baixos nivells. Per altra banda, la transmissió del VEB a través de la saliva és molt més eficaç que la de l'HVH-8.

Finalment, tal i com es mostra en la Taula 2, la majoria (el 70% a EUA, el 75% a Alemanya i el 92% a Nigèria) dels nens que presentaven evidència d'infecció per l'HVH-8 també tenien anticossos enfront del VEB, demostrant així la presència d'una coinfecció per aquests dos virus. Cal recordar que moltes de les línies cel·lulars derivades del PEL, que han estat fins ara un dels sistemes més robustos per entendre la persistència i la reactivació de l'HVH-8, es troben coinfectades per l'HVH-8 i el VEB [Drexler et al, 1998]. Aquest fet fa pensar en la possibilitat que els limfòcits B infectats per l'HVH-8 *in vivo* també ho estiguin pel VEB, com podrien estar indicant els nostres resultats. En cas de coinfecció, aquests dos virus podrien influenciar-se mútuament. S'ha observat que l'expressió de la proteïna LANA-1 de l'HVH-8 té la capacitat de regular l'expressió de proteïnes latents del VEB; entre elles, augmenta l'expressió de LMP-1, una proteïna de senyalització que pot expressar-se de manera constitutiva induint la transformació cel·lular [Groves et al, 2001]. Per altra banda, la proteïna responsable de la reactivació de l'HVH-8 (l'ORF50), s'uneix a una proteïna de la cèl·lula hoste (RBP-Jk) que és la diana de diverses proteïnes del programa latent del VEB implicades en la transformació cel·lular [Dourmishev et al, 2003]. Per tant, aquests mecanismes de regulació creuada podrien contribuir a la patogènesi de la infecció per ambdós virus.

Taula 2. Distribució de la infecció pels dos gammaherpesvirus humans en les tres poblacions estudiades. * Percentatge del total (N).

	N	HVH-8 + (total)	HVH-8 + VEB -	VEB + (total)	VEB + HVH-8 -	VEB + HVH-8 +
EUA	552	20	6	352	338	14 (2.5%)*
Alemanya	235	8	2	144	138	6 (2.6%)*
Nigèria	184	25	2	161	138	23 (12.5%)*

3.2. Caracterització de la virèmia en la infecció per l'HVH-8 i del seu paper en la patogènia del SK (Article II)

Fins a l'actualitat, els mètodes de PCR quantitativa aplicats a la detecció del genoma de l'HVH-8 en PBMC han donat informació només sobre el nombre total de genomes per un cert nombre de cèl·lules, expressat com a nombre de còpies per microgram (μg) de DNA total o còpies per milió de cèl·lules, sense donar importància a quin és el percentatge de la població cel·lular que està realment infectada [Boivin et al, 1999; Campbell et al, 1999; Lallemand et al, 2000; Boivin et al, 2000; Tedeschi et al, 2001; Pellet et al, 2001; Boivin et al, 2002; Quinlivan et al, 2002; Engels et al, 2003].

Els nostre objectiu principal era aprofundir en el coneixement sobre la infecció de les PBMC per part de l'HVH-8. Per dur a terme el present projecte de recerca, va ser necessari desenvolupar i optimitzar un mètode que permetés mesurar tres variables fonamentals:

- Freqüència de cèl·lules infectades per l'HVH-8 en sang: expressada com a número de cèl·lules HVH-8 positives per PCR per milió de PBMC.
- Freqüència del genoma de l'HVH-8 en la fracció sanguínia corresponent a les PBMC: número de còpies del genoma víric per milió de PBMC.
- Nombre mitjà de genomes per cèl·lula infectada: número de còpies del genoma víric dins de cada cèl·lula infectada. Aquest paràmetre ens dóna informació sobre la presència d'infecció lítica (alt nombre de còpies per cèl·lula infectada) o latent (baix nombre) en les PBMC.

El present projecte va ser dissenyat com a estudi transversal en una cohort de seguiment; els pacients es van reclutar durant les visites d'un estudi longitudinal paral·lel més ampli [Cannon et al, 2003; Laney et al, 2004]. Es van incloure 13 pacients MSM coinfectats per l'HVH-8 i el VIH; cinc tenien SK actiu, quatre havien tingut SK en el passat, i la resta no havien tingut mai SK però van ser considerats pacients de risc pel fet d'estar coinfectats. Per a dos dels pacients amb SK actiu, va ser possible recollir mostres en dues visites consecutives. A partir de la relació de les tres variables descrites amb la presència de lesions de SK, es van poder fer inferències per tal de comprendre millor la biologia de la infecció de les PBMC per part de l'HVH-8.

3.2.1. Desenvolupament i optimització dels mètodes

Per mesurar la freqüència de cèl·lules infectades i la freqüència de genomes de l'HVH-8 en PBMC, es va dissenyar una PCR quantitativa dúplex (per tal de poder normalitzar la càrrega vírica segons la quantitat de DNA de PBMC analitzat), combinada amb un assaig de dilucions limitants (LDA).

Una de les aplicacions dels assaigs tipus LDA és la de quantificar el nombre de virus en una mostra biològica. L'assaig consisteix en realitzar una sèrie de dilucions a partir de la mostra original, amb un cert nombre de rèpliques per dilució. A continuació, es determina mitjançant PCR el nombre de rèpliques positives respecte al total en cada dilució. A partir d'aquestes dades i aplicant un mètode estadístic basat en la distribució de Poisson s'estima la freqüència en la mostra original (vegeu apartat 3.2.1.1).

Per a realitzar un assaig de tipus LDA, és molt important disposar d'un mètode de PCR que detecti fins a una única còpia del genoma víric, amb una probabilitat al voltant del 63%, segons la distribució de Poisson, ja que només d'aquesta manera ens apropem a les freqüències reals. A més a

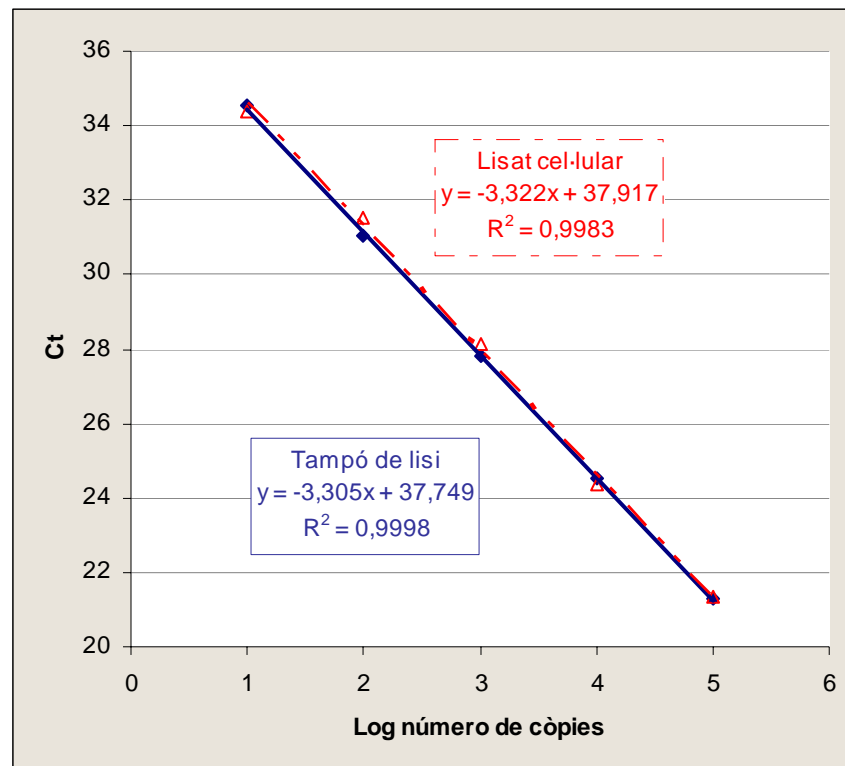
més, en el nostre cas, era necessària l'amplificació simultània del genoma de l'HVH-8 i d'un gen cel·lular de còpia única per poder conèixer amb precisió quin era el número de cèl·lules analitzades en cada reacció de PCR. Per últim, el mètode havia de permetre el processament (extracció del DNA, amplificació per PCR i detecció quantitativa) d'un alt nombre de rèpliques tal i com s'explica més endavant (60 per a cada tipus de LDA, és a dir, 120 per pacient).

Es van avaluar diversos mètodes d'extracció de DNA per tal d'establir quin era millor. La purificació en columnes (Qiagen) rendia DNA altament pur però tenia diversos inconvenients: (i) la variabilitat entre replicats era massa elevada, d'acord amb estudis anteriors [Tedeschi et al, 2001], (ii) el nombre mínim de cèl·lules que es podia processar era de 10^5 , mentre en les dilucions més altes del LDA era necessari treballar amb un nombre de cèl·lules menor, (iii) el volum mínim d'elució era de 50 μ l, i per tant el DNA no estava prou concentrat per realitzar directament la reacció de PCR, (iv) resultava molt llarg i laboriós a l'hora de realitzar un nombre tan elevat de purificacions per pacient. Es va optar, doncs, per un mètode de lisi crua que permetés realitzar la lisi cel·lular en un petit volum de tampó de lisi, sobre el qual es pogués afegir la mescla d'amplificació per realitzar la PCR directament. Per altra banda, el tampó de lisi o el lisat cel·lular en sí no havien d'inhibir la reacció de PCR. Es van avaluar diversos tampons de lisi diferents i finalment es van obtenir bons resultats amb el tampó especificat en l'apartat de Mètodes (Article II), de manera que la corba estàndard per a la quantificació del genoma víric no es veia gairebé alterada per la presència d'un lisat cru corresponent a 2×10^5 PBMC (Figura 6).

Paral·lelament també es van avaluar dos mètodes d'amplificació-detecció (PCR convencional i detecció per ELISA amb una sonda específica, vs. PCR en temps real en l'ABI Prism 7700). Tot i que els dos mètodes van mostrar una sensibilitat similar en la detecció de fins a una còpia, finalment vàrem escollir la PCR en temps real, per diversos motius: (i) la possibilitat de

quantificar els amplicons en temps real quan l'amplificació és exponencial i no hi ha cap reactiu limitant, enlloc de la semi-quantificació en punt final per ELISA, (ii) el fet de poder realitzar l'amplificació de dues dianes alhora i la seva detecció simultània mitjançant dues sondes específiques marcades amb diferents fluorocroms, (iii) per la possibilitat d'automatització del procés d'amplificació i detecció, (iv) per ser un sistema tancat on no hi ha manipulació de producte de PCR, i per tant, les possibilitats de contaminació entre reaccions queden reduïdes al mínim.

Figura 6. Efecte d'un lisat cru de 2×10^5 PBMC en la corba estàndard del plàsmid *orf37*-pPICZ α A després de l'estandardització. El pendent de la corba estàndard està al voltant de -3.3, indicant una eficiència de PCR de gairebé el 100% (cada 3.3 cicles de PCR, el nombre de còpies augmenta en un ordre de magnitud).

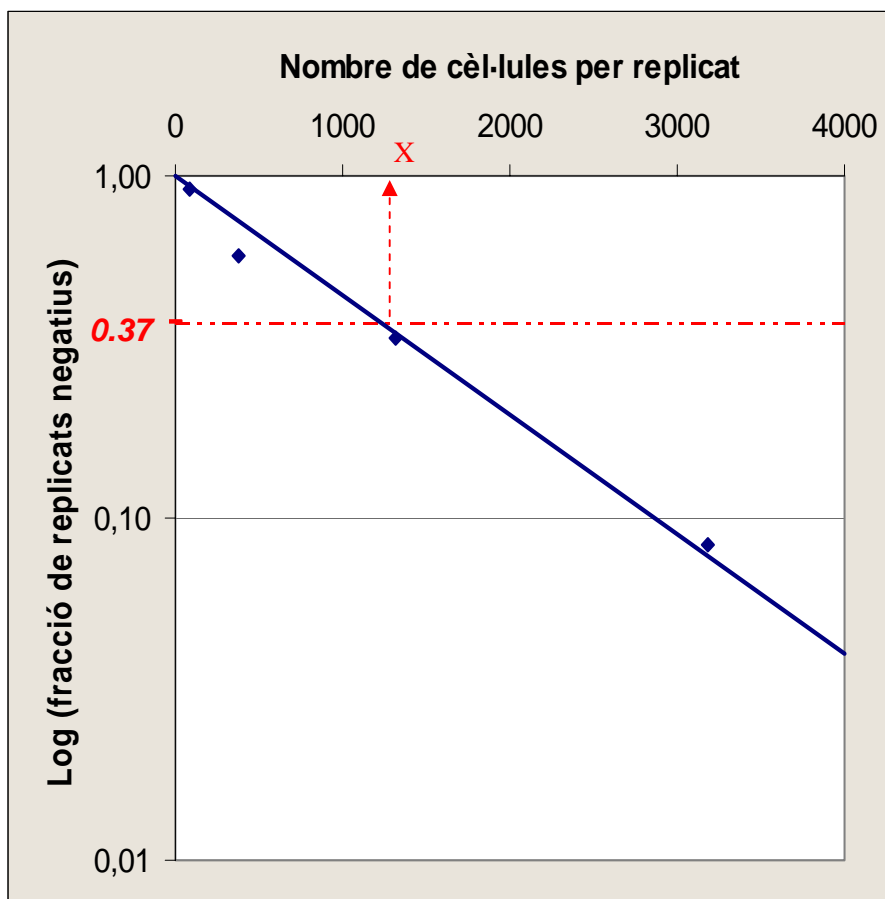


3.2.1.1. Assaig de dilucions limitants (LDA)

En experiments preliminars vam determinar que calia començar a partir de 4.2×10^6 PBMC i, per tant, 2×10^5 cèl·lules en cadascun dels replicats de la

primera dilució per poder determinar la freqüència de cèl·lules infectades. Basant-nos en el mètode descrit per Tripler *et al.*, es va realitzar una sèrie de dilucions 1:3 a partir de la suspensió de PBMC original, amb 12 rèpliques per dilució [Tripler et al, 1999]. A continuació, es va determinar el nombre de rèpliques positives respecte el total en cada dilució mitjançant PCR. A partir d'aquestes dades i aplicant un mètode estadístic basat en la distribució de Poisson es van estimar les freqüències esmentades (Figura 7).

Figura 7. Càlcul de la freqüència de cèl·lules infectades segons la distribució de Poisson. $F_0 = e^{-\mu}$ i per tant $\mu = -\ln(F_0)$, on F_0 és la fracció de replicats negatius, i μ és el nombre mig de cèl·lules infectades per replicat. Quan $\mu = 1$, $F_0 = 37\%$, i el valor de X ens indica el nombre de PBMC que contenen una cèl·lula infectada. La pendent ens indica la freqüència (com més vertical, més alta és la freqüència).

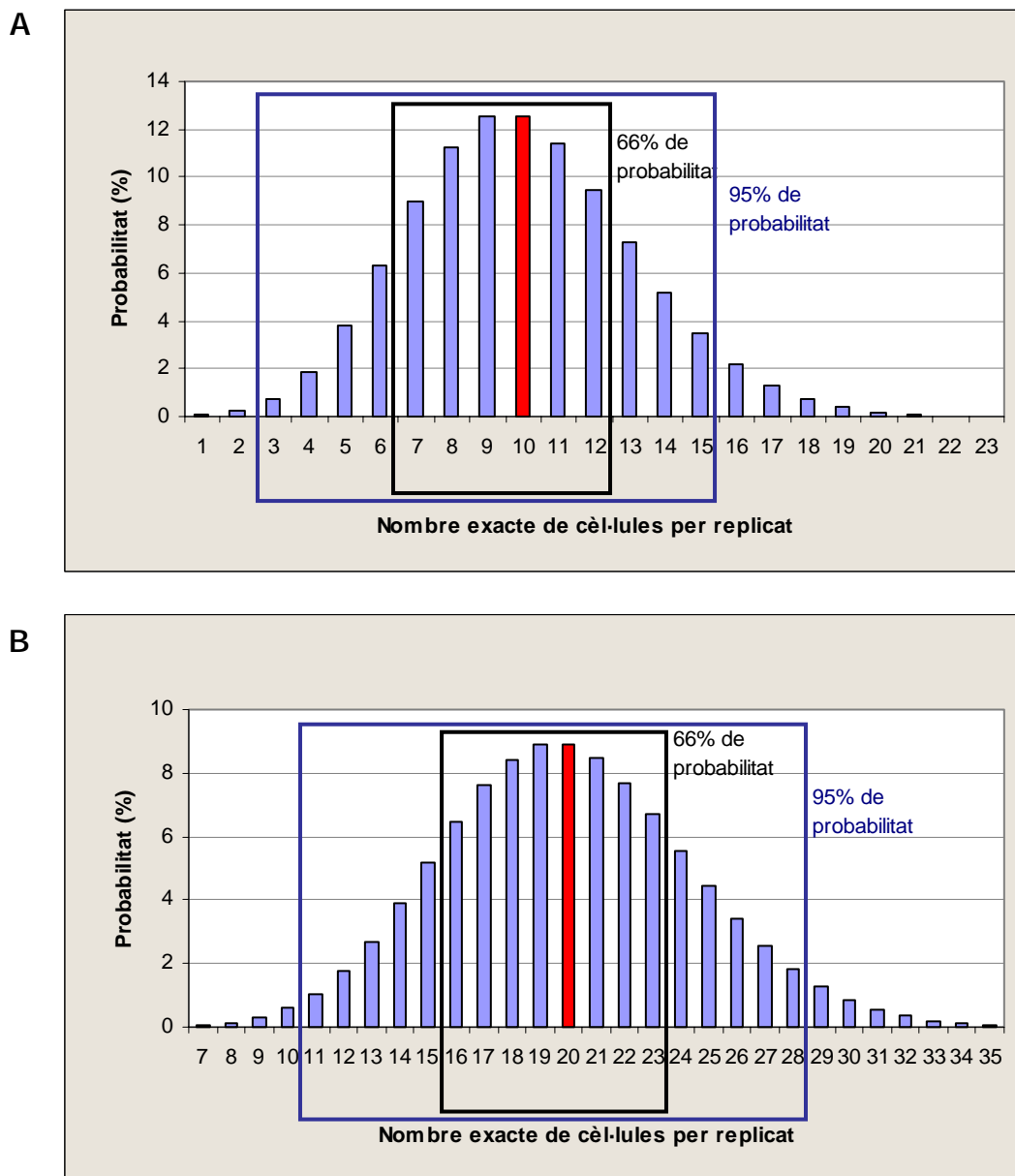


Es van utilitzar dos mètodes en paral·lel. Per una banda, es va realitzar un LDA per dilució de cèl·lules mitjançant la dilució de les PBMC abans de la lisi cel·lular, per tal de calcular la freqüència de cèl·lules infectades per l'HVH-8 (F1: nombre de cèl·lules que contenen un o més genomes de l'HVH-8). Per altra banda, es va realitzar un LDA per dilucions de DNA mitjançant la dilució del DNA una vegada les PBMC han estat lisades, per tal d'obtenir la freqüència del genoma de l'HVH-8 (F2: nombre de cèl·lules lisades necessàries per detectar una mitjana d'un genoma víric) (Figura 1, Article II). El valor de $F1 / F2$ dona informació sobre el nombre mitjà de còpies del genoma de l'HVH-8 per cèl·lula infectada. Els càlculs per tal d'aplicar la distribució de Poisson a una sèrie de dilucions es van realitzar informàticament amb el programa QUALITY [Mullins Molecular Retrovirology Lab, 2001] basat en el mètode de la χ^2 mínima. Es va utilitzar el test estadístic de la χ^2 i es van obtenir els valors de la p per comprovar l'ajustament de les dades al model. Els valors de $p \leq 0.05$ es consideren com indicatius de que la distribució de còpies en les diferents rèpliques no s'ajusta al model utilitzat (p.e.: si la mostra original no és prou homogènia, si el volum dels replicats no és el mateix, o si les condicions experimentals varien entre les reaccions de PCR). Per altra banda, valors de $p > 0.05$ indiquen que les dades s'adapten raonablement al model [Rodrigo et al, 1997].

El mètode de LDA va ser validat utilitzant la línia cel·lular BCBL-1 infectada per l'HVH-8. Es van realitzar experiments en dos tipus de cultius. En el primer, es va realitzar un cultiu en condicions normals, sota les quals les cèl·lules presentaven una infecció majoritàriament latent; en el segon, es va induir el cicle lític del virus mitjançant tractament amb TPA. Les cèl·lules BCBL-1 cultivades es van diluir en PBMC d'un donant de sang HVH-8 negatiu, per tal d'obtenir suspensions amb una freqüència de cèl·lules infectades coneguda i similar a l'observada en pacients en experiments preliminars (10 o 20 BCBL-1 per milió de PBMC). Després de realitzar els dos tipus de LDA, les freqüències de cèl·lules infectades van ser similars a les

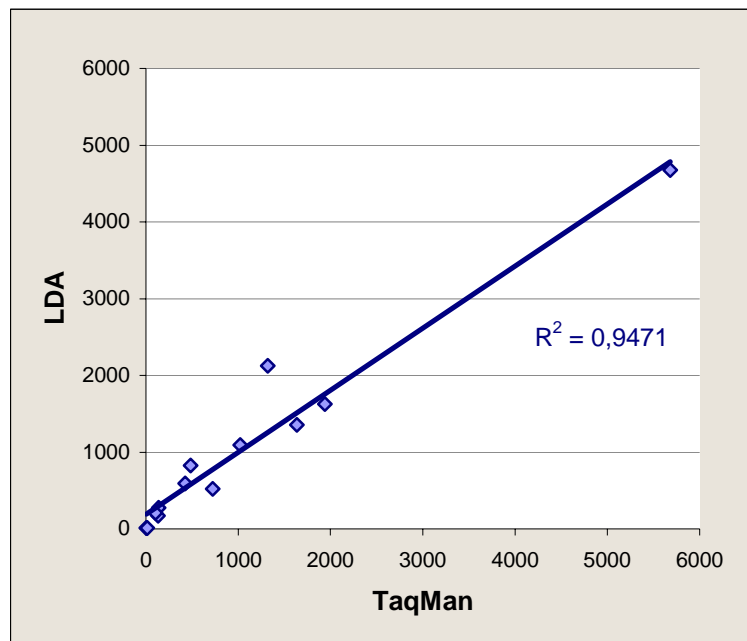
esperades (Taula 1, Article II). Tenint en compte la distribució de Poisson, en agafar un volum de suspensió equivalent a 10 cèl·lules, de fet, en dos de cada tres casos estarem agafant de 7 a 12 cèl·lules, i amb un 95% de probabilitats estarem agafant de 3 a 15 cèl·lules (Figura 8a). De la mateixa manera, en intentar agafar 20 cèl·lules, podem estar agafant qualsevol número entre 11 i 28 cèl·lules (Figura 8b). Per tant els nombres obtinguts en els nostres experiments no difereixen dels esperats. Per últim, els valors de p proporcionats per QUALITY van ser sempre superiors a 0.05, indicant que les dades s'ajustaven bé al model estadístic.

Figura 8. Variació en el nombre de cèl·lules per pouet segons la distribució de Poisson quan esperem que n'hi hagi 10 (A) o 20 (B).



El LDA també va ser validat comparant les freqüències del genoma de l'HVH-8 obtingudes per aquest mètode qualitatiu (lectura del nombre de replicats positius i negatius en cada dilució), amb aquelles freqüències obtingudes segons la quantificació en temps real amb la corba estàndard basada en dilucions 1:10 seriadades del plàsmid *orf37*-pPICZ α A. Els dos mètodes van presentar una bona correlació (Figura 9).

Figura 9. Correlació entre la quantificació de freqüències del genoma de l'HVH-8 obtinguda per PCR en temps real (TaqMan) i per LDA (inclou els experiments realitzats amb les PBMC de pacients i amb la línia cel·lular BCBL-1). Els eixos expressen el nombre de cèl·lules necessàries per a la detecció del genoma de l'HVH-8.



3.2.1.2. PCR en temps real

La PCR en temps real amb l'ABI Prism 7700 es basa en la utilització d'una sonda TaqMan específica per a la diana que desitgem amplificar. Aquesta sonda està marcada amb un fluoròfor a 5' i un *quencher* a 3', de manera que mentre la sonda està intacta l'energia emesa pel fluoròfor és

captada pel *quencher* (fenomen de Förster). En la fase d'elongació de cada cicle de la PCR, la *Taq* polimerasa degrada la sonda amb la seva activitat 5'→3' nucleasa alliberant el fluoròfor, que quan ja no està a prop del *quencher* emet fluorescència de manera directament proporcional al nombre de còpies presents a l'inici de la reacció. Aquesta tècnica permet detectar dues o més dianes d'amplificació en la mateixa reacció de PCR mitjançant la utilització de sondes específiques marcades amb diferents fluoròfors.

Per al nostre estudi va ser necessari optimitzar una reacció de PCR dúplex per a l'amplificació simultània de l'*orf 37* de l'HVH-8 i d'un gen cel·lular de còpia única per tal de poder quantificar tant del nombre de còpies del genoma víric com de cèl·lules presents en cada reacció. Es va realitzar un primer intent d'amplificació simultània de les dues dianes utilitzant sondes i *primers* per l'*orf 37* de l'HVH-8 i la β -globina cel·lular, però degut a la interacció entre els dos parells de *primers* no s'obtenia amplificació.

Finalment, es va poder optimitzar l'amplificació simultània de l'*orf 37* de l'HVH-8 i el gen de la RNasa P cel·lular. Es va partir de condicions prèviament optimitzades per a reaccions singleplex amb concentracions de 500/100 nM per als *primers*/sonda de l'*orf 37* [Stamey et al, 2001] i de 300/100 nM per als de la RNasa P (Karen McCaustlan, comunicació personal). Després de provar diverses concentracions de *primers* i sondes per a les dues dianes es va trobar que en presència d'una quantitat de DNA cel·lular equivalent a 2×10^5 PBMC la coamplificació de les dues dianes era òptima a una concentració de 900 nM i 250 nM pels *primers* i la sonda específics per l'*orf 37*, respectivament, i de 100 nM pels *primers* i la sonda específics per la RNasa P.

Els passos d'optimització necessaris van ser els següents (vegeu Annex 2):

1. Comprovació de l'absència d'interaccions entre els dos parells de *primers* i sondes.
2. Optimització de les concentracions de *primers*/sondes:
orf37 HVH-8: augmentades fins a 900/250 nM
RNasa P humana: concentració dels *primers* disminuïda fins a 100 nM
3. Estudi de l'eficiència de la coamplificació vs. amplificació en singleplex.
4. Establir el límit de sensibilitat: fins a una còpia de plàsmid tant en presència de tampó de lisi com d'un lisat cel·lular corresponent a 2×10^5 PBMC d'un donant de sang HVH-8 negatiu.

En tots els assaigs, la corba estàndard (cicle llindar o Ct vs. el logaritme del nombre de còpies) obtinguda a partir de dilucions seriades del plàsmid *orf37*-pPICZ α A va ser linial ($r^2 \geq 0.99$). El pendent de les corbes estàndard indicava una eficiència d'optimització per sobre del 90% per l'*orf 37* i per sobre del 85% per a la RNasa P, i l'efecte d'un lisat cru corresponent a 2×10^5 PBMC d'un donant de sang PCR negatiu per l'HVH-8 va tenir efectes negligibles sobre l'eficiència d'amplificació (Figura 6).

La presència d'inhibidors en les mostres clíniques processades va ser avaluada de diverses maneres: (i) el nombre de còpies de RNasa P va disminuir sempre de manera linial al llarg de la sèrie de dilucions de cèl·lules i de lisats cel·lulars; (ii) l'amplificació d'un control positiu intern (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents Kit) en concentracions limitants [Stamey et al, 2001] en presència de la concentració de cèl·lules més elevada (2×10^5 PBMC en 10 μ l) va ser sempre positiva i, per tant, les reaccions de PCR negatives per l'HVH-8 ho eren veritablement i no fruit d'inhibició.

La sensibilitat de la tècnica va ser avaluada mitjançant l'amplificació de dilucions seriades del plàsmid *orf37*-pPICZ α A a partir d'una suspensió quantificada per espectrofotometria a 260 vs. 280 nm. En cada placa de 96

pouets de PCR es van incloure sis replicats amb una còpia del plàsmid, i sis replicats més amb 10 còpies; va ser possible amplificar fins a una còpia del plàsmid en presència tant de tampó de lisi com d'un lisat cel·lular cru corresponent a 2×10^5 PBMC d'un donant de sang PCR negatiu per l'HVH-8, a partir d'un 50% de les rèpliques avaluades (rang, 17-83%). Aquest percentatge de reaccions positives està d'acord amb l'esperat segons la distribució de Poisson (63%).

Per altra banda el recompte de cèl·lules obtingut segons la quantificació del gen de la RNasa P per PCR, i el recompte realitzat en hemocitòmetre van diferenciar-se com a màxim per un factor de 2. Cal tenir en compte que el recompte en hemocitòmetre es va realitzar a partir de la suspensió cel·lular inicial abans de realitzar la lisi cel·lular, les dilucions i l'aliquotació de la placa de PCR, processos que poden afectar el nombre de cèl·lules que acaben estant presents en cada pouet.

Finalment, en cada placa es van afegir controls negatius (incloent-hi reaccions amb aigua de grau molecular enlloc de DNA, i reaccions amb un lisat cru de PBMC d'un donant de sang PCR negatiu per l'HVH-8) i no van ser mai positius. A més a més els replicats negatius per sota de les dilucions limitants obtingudes amb el material clínic (PBMC dels pacients avaluats) van actuar també com a controls negatius.

3.2.2. Caracterització de la infecció per HVH-8 en la línia cel·lular BCBL-1

A partir dels experiments realitzats amb la línia cel·lular BCBL-1, es va poder calcular el nombre mitjà de genomes per cèl·lula. Aquest va ser de 100 en el cultiu en condicions normals on les cèl·lules estan majoritàriament en estat latent, i de 307 en el cultiu on es va afegir TPA per tal d'induir el cicle lític del virus. Tanmateix, hem de tenir en compte que en els cultius no

induïts si bé en la majoria de cèl·lules el virus es troba en fase latent, aproximadament en un 1% de les cèl·lules el virus entra espontàniament en cicle lític (segons vàrem determinar per immunofluorescència amb una anticòs anti-glicoproteïna B, una proteïna vírica expressada durant el cicle lític). Per altra banda, quan vam induir un cultiu de BCBL-1 amb TPA, només en un 10% de les cèl·lules el virus va passar a cicle lític veritablement (també determinat per immunofluorescència). Si partim de la base que el nombre de genomes per replicat [Gr] és igual al nombre de cèl·lules infectades en aquell replicat [i] multiplicat pel nombre mitjà de genomes per cèl·lula [Gc], i [i] és igual al factor de la freqüència de cèl·lules infectades [F] pel nombre de cèl·lules per replicat [n],

$$Gr = i \times Gc$$

$$i = F \times n$$

per calcular el nombre de genomes per cèl·lula lítica i per cèl·lula latent, es pot plantejar el següent sistema de dues equacions, tenint en compte el percentatge observat de cèl·lules en estat de replicació lítica i latent, tant en condicions d'inducció amb TPA, com en cultius no induïts:

$$[Gr]_{\text{inducció}} = (10\%[i] \times [G_{\text{lític}}]) + (90\%[i] \times [G_{\text{latent}}])$$

$$[Gr]_{\text{no inducció}} = (1\%[i] \times [G_{\text{lític}}]) + (99\%[i] \times [G_{\text{latent}}])$$

On, $[G_{\text{latent}}]$ és nombre mitjà de genomes per cèl·lula latentment infectada, i $[G_{\text{lític}}]$ és nombre mitjà de genomes per cèl·lula líticament infectada. El nombre mig de genomes per cèl·lula infectada és igual a la suma dels genomes presents en les cèl·lules lítiques i d'aquells presents en les cèl·lules latents.

Si pel contrari utilitzem el sistema d'equacions següent, on el nombre mig de genomes per cèl·lula infectada té en compte les proporcions de cèl·lules lítiques i latents, així com el nombre mig de genomes per cèl·lula en aquestes dues condicions,

$$[G]_{\text{inducció}} = (0.9 \times [G]_{\text{latent}}) + (0.1 \times [G]_{\text{lític}})$$

$$[G]_{\text{no inducció}} = (0.99 \times [G]_{\text{latent}}) + (0.01 \times [G]_{\text{lític}})$$

també obtenim els mateixos resultats.

Resolent aquest sistema d'equacions a partir dels resultats obtinguts en els experiments amb cèl·lules BCBL-1, trobem que les cèl·lules infectades de forma latent contenen una mitja d'uns 80 genomes de l'HVH-8, mentre que aquelles infectades líticament en poden tenir aproximadament 2400. El valor obtingut per cèl·lules infectades latentment és similar als obtinguts prèviament per a la mateixa línia cel·lular mitjançant PCR en temps real (70 còpies) [Lallemand et al, 2000], i més elevat que el valor obtingut per tècniques d'hibridació *in situ* (25-30 còpies) [O'Neill et al, 1997; Stamey et al, 2001]. Tenint en compte que el percentatge d'inducció després del tractament amb TPA depèn de diversos factors, com són el número del passatge cel·lular i la llargada i condicions del tractament, aquests resultats obtinguts simulant freqüències observades en pacients segons estudis preliminars demostren que el mètode dissenyat era prou exacte com per ser utilitzat en material clínic.

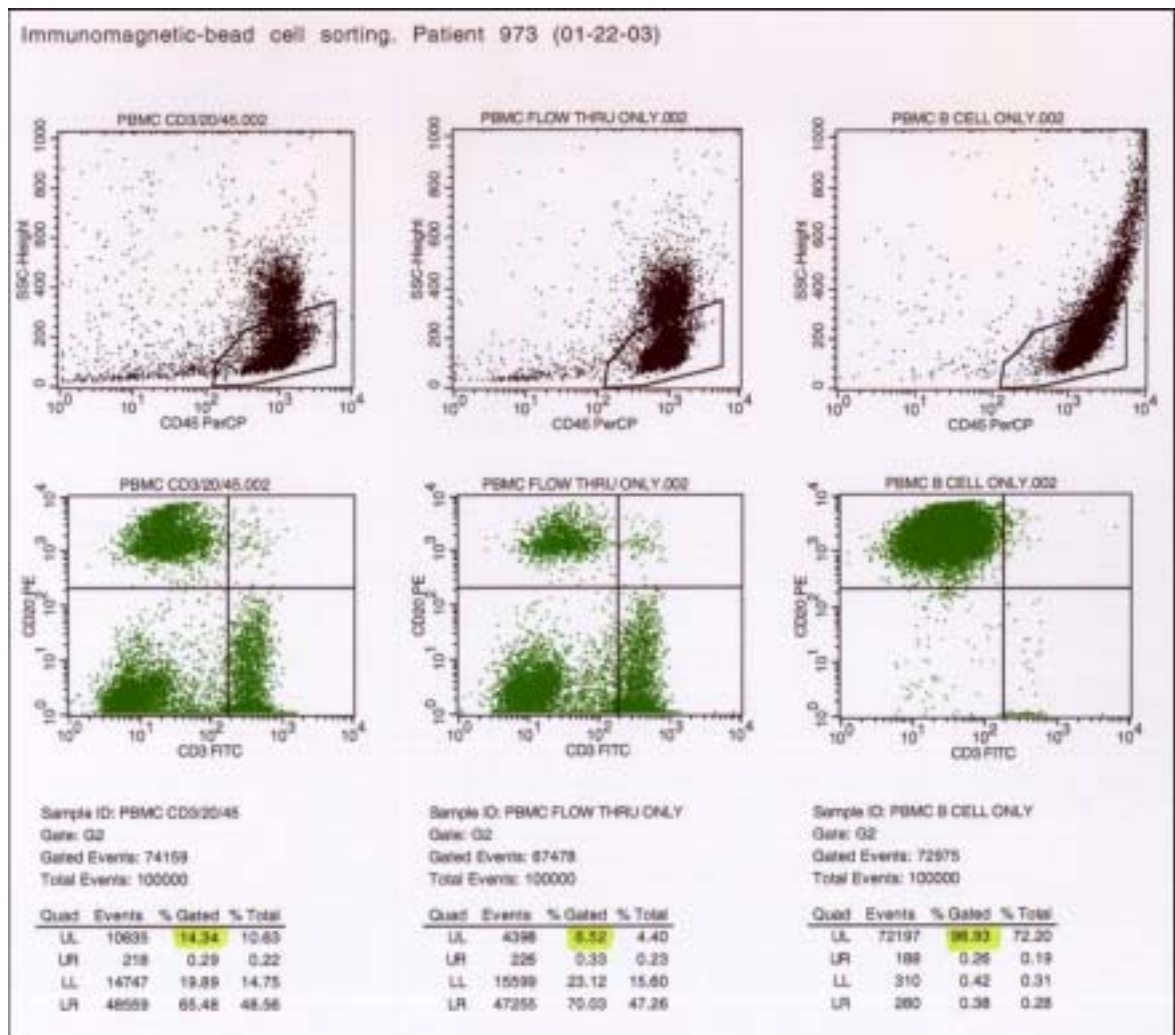
3.2.3. Caracterització de la infecció per HVH-8 en les PBMC

El nombre de genomes vírics per cèl·lula infectada en els pacients PCR-positius va variar entre 3 i 331 (mediana, 134), com es pot veure en la Taula 3 (Article II).

Pel pacient 12, les PBMC es van obtenir per leucafèresi i, per tant, vam disposar de prou cèl·lules tal de per realitzar una separació dels limfòcits B mitjançant perles immunomagnètiques sensibilitzades amb anticòs anti-CD19 (marcador de superfície específic de limfòcits B). A partir de les tres subpoblacions cel·lulars obtingudes (PBMC totals, limfòcits B i cèl·lules no-B

incloent-hi bàsicament limfòcits T i monòcits), es van realitzar els dos tipus de LDA. La freqüència de cèl·lules infectades va ser més alta en els limfòcits B (43 per milió) que en les cèl·lules no-B (6 per milió) o PBMC totals (18 per milió). La puresa de les tres subpoblacions es va avaluar mitjançant citometria de flux. Es van utilitzar els següents anticossos monoclonals marcats amb fluorocroms: anti-CD20-PE (marcador de superfície de limfòcits B), anti-CD45-PerCP (antigen comú leucocitari), i anti-CD3-FITC (marcador de limfòcits T); es va seleccionar el núvol de limfòcits segons la seva posició en el panell CD45 vs. *side scatter*, i es va calcular el percentatge de limfòcits B (CD20 positius, CD3 negatius) tal i com es pot observar en la Figura 10. Mentre el grau de puresa dels limfòcits B va ser molt elevat (98.3%), després de la separació va restar un 6.5% de contaminació per limfòcits B en la subpoblació no-B. Alguns autors han defensat que l'HVH-8 també pot infectar monòcits [Blasig et al, 1997; Monini et al, 1999b]; no obstant això, el fet que les cèl·lules no-B resultessin positives per PCR podria ser degut a aquesta contaminació per limfòcits B amb una probabilitat del 46%. Per tant, els resultats suggereixen que la infecció per HVH-8 està localitzada principalment en els limfòcits B, d'acord amb altres estudis [Ambroziak et al, 1995; Harrington et al, 1996; Mesri et al, 1996]. Per altra banda, el nombre mitjà de genomes per limfòcit B va ser de 2.5, resultat indicador d'infecció latent en aquestes cèl·lules en concordança amb els baixos nombres de còpies trobats en cèl·lules infectades de forma latent.

Figura 10. Anàlisi per citometria de flux de la puresa de les dues subpoblacions cel·lulars separades immunomagnèticament (limfòcits B i resta de cèl·lules mononuclears) vs. PBMC totals.



S'ha de tenir en compte, però, que el nombre mitjà de genomes per cèl·lula no ha de ser interpretat com a una distribució homogènia dels genomes entre les cèl·lules infectades, sinó que els nostres resultats suggereixen que segurament existeix una forta polarització en el nombre de còpies per cèl·lula entre aquelles infectades latentment i aquelles que presenten una infecció lítica. En els experiments realitzats amb la línia cel·lular BCBL-1 es va observar un augment del nombre mig de genomes per cèl·lula d'un factor de 3 entre cultius no induïts i induïts a la replicació lítica (de 100 a 307 còpies). No obstant això, aquest augment relativament

petit estava indicant la presència de replicació lítica amb un nombre de genomes per cèl·lula de fins a 2400 en un petit percentatge de les cèl·lules (10%), mentre aquelles que presentaven una infecció latent en tindrien només al voltant de 80. Si observem els resultats obtinguts en els pacients d'aquest estudi (Taula 3, Article II), veurem que les diferències entre el nombre de genomes per cèl·lula infectada detectat en les seves PBMC són de fins a un factor de 70. Per tant, podem treure'n les següents hipòtesis: (1) els nivells de càrrega vírica per cèl·lula infectada de menys de 10 còpies indicarien la presència d'una replicació latent estretament regulada; (2) els valors més elevats indicarien la presència apreciable de replicació lítica en una fracció de les PBMC, mentre el significat dels valors intermedis és més difícil d'esbrinar però probablement representarien la presència d'infecció lítica en un percentatge més petit de la població de PBMC; (3) la relació entre la fracció de cèl·lules lítiques i latents probablement varia amb el temps.

Per il·lustrar aquestes hipòtesis, podem recordar el cas dels limfòcits B del pacient 12, esmentat anteriorment, els quals presenten per terme mig 2.5 genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada indicant una replicació latent (hipòtesi 1). En l'altre extrem, el nombre més elevat de genomes per cèl·lula (331) es va trobar en el pacient 8, el qual tenia SK cutani progressiu. Aquest pacient també mostrava títols d'anticossos enfront de l'antigen lític K8.1 molt elevats i en la visita posterior es va detectar el virus en plasma. Aquests factors semblen indicar l'existència de replicació lítica en les PBMC d'aquest malalt (hipòtesi 2), així com l'extensió de la infecció a altres PBMC i probablement a altres teixits (en la següent visita va presentar una freqüència de cèl·lules infectades més alta, i evolució del SK cap a la orofaringe). Aquest pacient no estava en HAART, tenia recomptes de CD4 decreixents, i una càrrega vírica pel VIH molt elevada; aquests tres factors podrien haver intervingut en un control insuficient de la càrrega vírica de l'HVH-8 per part d'una resposta immune deficient. S'ha descrit que la proteïna Tat del VIH-1, juntament amb altres factors, podria activar la

replicació de l'HVH-8 a través de la inducció del promotor Rta, el qual desencadena el cicle lític [Varthakavi et al, 1999]. Per altra banda, la HAART s'ha associat a valors baixos de càrrega vírica del HVH-8 en PBMC, i la regressió de les lesions de SK, probablement a través de la millora en les funcions immunes [Pellet et al, 2001] però també per un efecte directe dels inhibidors de proteases com a factors antiangiogènics [Sgadari et al, 2002]. Títols d'anticossos elevats enfront dels antígens lítics d'un virus oncogènic com és el VEB, s'han relacionat amb el desenvolupament de càncer en el cas del limfoma de Burkitt i el carcinoma nasofaringi [Kanegane et al, 2002]. Així mateix, un augment del títol d'anticossos enfront d'antígens lítics de l'HVH-8 s'ha relacionat amb un augment del risc de desenvolupar SK [Chatlynne et al, 1998; Rezza et al, 1999; Beral et al, 1999]. Finalment, cal remarcar que en els dos pacients en els quals el SK va progressar entre visites consecutives, la càrrega vírica en PBMC va augmentar; en un pacient aquest augment va ser degut a un augment de genomes per cèl·lula infectada, i en un altre a un augment de la freqüència de cèl·lules infectades, il·lustrant la hipòtesi 3, que la relació entre la fracció de cèl·lules lítiques i latents probablement varia amb el temps, resultant en canvis en la càrrega vírica. El fet de poder obtenir mostres d'un parell de pacients en dos moments diferents ens va permetre veure canvis en l'activitat vírica en sang en qüestió de pocs mesos. Aquests resultats concorden amb les intermitències en la detecció del genoma de l'HVH-8 en l'estudi paral·lel en el qual es van poder analitzar longitudinalment 87 pacients [Laney et al, 2004].

Tres dels vuit pacients amb un resultat de PCR positiu en PBMC (i cap dels pacients PCR-negatius en PBMC –Taula 2 Article II–) van resultar simultàniament positius en el plasma, fet que reforça la idea que en aquests pacients estava tenint lloc una replicació vírica lítica en les PBMC, d'acord amb altres estudis [Decker et al, 1996; Polstra et al, 2003]. No podem excloure la possibilitat que els virions presents en el plasma procedissin de cèl·lules infectades no circulants (epiteliais o endotelials). No obstant això,

tots els pacients en els quals es va detectar el virus en plasma també van resultar PCR-positius en PBMC, mentre que cap dels pacients PCR-negatius en PBMC va mostrar partícules víriques lliures en plasma.

Hi ha dues teories sobre la infecció de les PBMC per part de l'HVH-8; alguns autors creuen que la presència del virus en les cèl·lules sanguínies seria el resultat de la infecció de les mateixes en circular prop de focus d'infecció com són les lesions de SK; l'altre teoria defensa, per contra, que les cèl·lules sanguínies infectades podrien ser les responsables de l'arribada del virus a d'altres teixits [Blasig et al, 1997]. Els nostres resultats semblen estar d'acord amb la segona teoria, ja que hem demostrat la possibilitat d'infecció lítica en les PBMC; per tant aquestes cèl·lules poden ser la font de virus per a la infecció de cèl·lules endotelials i la posterior iniciació de les lesions del SK. La població de PBMC podria incloure cèl·lules progenitores d'aquelles que trobem en les lesions de SK; en un estudi es van poder detectar cèl·lules similars a les típiques cèl·lules fusiformes del SK en la fracció sanguínia de les PBMC en pacients VIH-positius, i aquesta troballa podria explicar la naturalesa multifocal d'aquesta malaltia [Browning et al, 1994]. Més recentment també s'ha demostrat que les línies cel·lulars derivades del PEL i tractades amb TPA tenen la capacitat de transmetre el virus a cèl·lules endotelials en cultiu *in vitro* [Sakurada et al, 2001].

Alguns estudis d'expressió gènica han intentat resoldre la qüestió de la replicació lítica de l'HVH-8 en PBMC mitjançant la detecció de trànscrips o mRNA lítics [Fakhari i Dittmer, 2002; Polstra et al, 2003]. En condicions de replicació lítica, certs trànscrips poden arribar a estar en un nombre de còpies més elevat que el propi genoma víric i, en principi, es podrien detectar més fàcilment. No obstant això, com es discuteix més endavant, la detecció dels àcids nucleics vírics (ja sigui DNA o mRNA) depèn tant o més de la freqüència de cèl·lules infectades que del nombre de còpies per cèl·lula infectada. Polstra *et al.* van veure que els mRNA dels gens lítics vBcl-2 i vIL-6 eren més freqüents en pacients en fases avançades de SK; tot i

això els valors obtinguts no passaven de 5 còpies/ng de RNA total o estaven per sota els límits de quantificació [Polstra et al, 2003]. En molts casos aquests estudis es veuen limitats per la inestabilitat i la curta vida mitja dels transcrits, que provoca una subestimació del percentatge de cèl·lules que estan realment infectades de manera lítica [Fakhari i Dittmer, 2002].

3.2.4. Relació entre la càrrega vírica i la presència de lesions de SK

En aquest estudi, tot i l'ensolapament parcial, el rang de les freqüències de cèl·lules infectades en els pacients PCR-positius amb SK va ser major a l'observada en pacients d'alt risc (0.84 a 29 per milió de PBMC vs. 0.34 a 3.3 per milió de PBMC). Aquests resultats concorden amb els d'aquells estudis que han demostrat que la detecció del genoma de l'HVH-8 correlaciona amb l'aparició de SK [Ambroziak et al, 1995; Whitby et al, 1995]. Tot i que el nombre de pacients inclosos en l'estudi era relativament baix, la taxa de detecció del genoma víric en pacients amb SK (6 de 9) també va ser més alta que entre individus d'alt risc (1 de 4). Tal i com s'ha esmentat anteriorment, en els dos pacients en els quals el SK va progressar de la pell a la mucosa orofaríngia entre visites consecutives, la càrrega vírica va augmentar. Aquest fet concorda amb la troballa anteriorment esmentada que existeixen cèl·lules progenitores de les cèl·lules fusiformes típiques del SK en la fracció sanguínia de les PBMC les quals podrien ser responsables de la iniciació de noves lesions [Browning et al, 1994].

Per altra banda, un dels pacients amb SK progressiu presentava una càrrega vírica de menys d'un genoma per 6 milions de PBMC. Aquest resultat concorda amb observacions prèvies que la presència de lesions no sempre està associada a valors de càrrega vírica alta en sang [Boivin et al, 1999; Lallemand et al, 2000; Boivin et al, 2000].

De fet, tres dels pacients amb SK i tres dels pacients a risc van mostrar resultats de PCR negatius en PBMC en condicions estàndard (12 rèpliques per dilució). Per tant, aquests pacients tenien una freqüència de menys de 0.21 a 1 cèl·lula infectada per milió de PBMC. No obstant això, en els pacients dels quals es va poder obtenir un volum de sang més gran, quan es va repetir l'anàlisi partint d'un nombre de cèl·lules més gran (17 o 22 enlloc de 12 rèpliques en la primera dilució, Taula 2 Article II), el pacient número 4 va esdevenir positiu amb una freqüència de 0.34 genomes per milió de cèl·lules. Com que en els experiments realitzats es va observar que les cèl·lules infectades contenen més d'una còpia del genoma de l'HVH-8, aquest pacient tindria com a màxim una cèl·lula infectada en més de 3 milions de PBMC, o aproximadament 2 ml de sang. Això indica que en els pacients PCR negatius, el virus no estaria necessàriament absent, sinó que es podria trobar en freqüències per sota el límit de detecció de l'assaig dissenyat.

En conclusió, tot i que s'observa una clara associació entre els nivells de virèmia i la malaltia, la càrrega vírica no està tan estretament relacionada amb la patogènia del SK com, per exemple, en el cas del VEB i la PTLD tal i com s'explica en el següent apartat. La taxa de detecció de l'HVH-8 en sang podria dependre del nivell d'immunosupressió de l'hoste [Whitby et al, 1995]. Els títols d'anticossos relativament elevats en pacients amb DNA no detectable en sang (com el pacient número 1, amb SK), podrien indicar que el virus està present en alguna altra regió de l'organisme en fase de replicació lítica o latent, mantenint nivells alts d'anticossos contínuament, com és el cas de l'HV γ 68 [Stevenson i Doherty, 1998].

Per l'HVH-8, la rellevància clínica de la càrrega vírica podria ser específica de malaltia. En la MCD, la càrrega vírica de l'HVH-8 correlaciona amb les exacerbacions de la malaltia així com amb la resposta al tractament [Grandadam et al, 1997; Lallemand et al, 2000], i és útil per al monitoratge de la malaltia [Corbellino et al, 2001]. En canvi, pel SK encara no està clar si

la detecció del DNA de l'HVH-8 en sang té valor clínic pel que fa al diagnòstic o al pronòstic. Aquest estudi suggereix que la detecció del DNA de l'HVH-8 pot tenir un valor clínic, sempre que s'utilitzi un tipus i un tamany de mostra adequats per poder tenir la certesa que es detectarà el genoma víric amb seguretat quan aquest estigui present en sang (vegeu apartat 3.2.6). La determinació quantitativa de la càrrega vírica per PCR pot ajudar al diagnòstic del SK, especialment en pacients VIH i HVH-8 seropositius quan apareixen lesions en regions no cutànies que no són fàcilment identificables mitjançant inspecció visual. És necessari continuar estudiant la cinètica de la càrrega vírica al llarg de l'evolució de la infecció per l'HVH-8 i les diferents etapes del SK. Les recomanacions metodològiques que nosaltres proposem (vegeu Annex 3) ajudaran a valorar la utilitat clínica de la determinació de la càrrega vírica pel que fa al fet d'establir la possibilitat que un pacient té de desenvolupar SK, identificar aquells pacients que requereixen un monitoratge més proper, i guiar intervencions terapèutiques que redueixen la incidència del SK.

3.2.5. Diferències i semblances biològiques en la infecció de les PBMC pels dos gammaherpesvirus humans

En primer lloc, tot i que tres dels nou pacients amb SK van ser negatius per PCR, la càrrega vírica en aquells que eren PCR-positius calculada com a nombre de còpies del genoma per milió de PBMC va ser de 12 a 1090 (mediana, 244), d'acord amb altres estudis que han utilitzat mètodes de PCR quantitativa [Boivin et al, 2000; Boivin et al, 2002; Quinlivan et al, 2002]. No obstant això, si ho comparem amb el rang de càrregues víriques per al VEB detectades en pacients amb PTLD, aquests valors són relativament baixos [Rowe et al, 2001]. Tot i que els limfoblasts infectats pel VEB proliferen en els ganglis limfàtics, i les cèl·lules circulants infectades són limfòcits B amb el virus en estat latent [Babcock et al, 1999], els pacients de PTLD presenten càrregues víriques de 5.000 a 50.000 còpies per milió de

PBMC en el moment del diagnòstic, un valor que és de 1.000 a 10.000 vegades més alt que en individus seropositius sans [Miyashita et al, 1995; Rowe et al, 1997]. En comparació amb l'HVH-8 i el SK, la càrrega vírica del VEB en PBMC sembla estar més estretament relacionada amb el desenvolupament de les neoplàsies associades a la infecció per aquest virus, incloent-hi el carcinoma nasofaringi, la malaltia de Hodgkin, la PTLD i el limfoma associat a la sida [Fan i Gulley, 2001].

En segon lloc, la freqüència de cèl·lules infectades en pacients PCR-positius amb SK va ser relativament baixa (de 0.84 a 29 per milió de PBMC, Figura 2 de l'Article II). Aquests valors s'ensolapen amb el rang de freqüències observades en portadors sans del VEB, els quals presenten de 0.1 a 24 cèl·lules latentment infectades per milió de PBMC [Yang et al, 2000]. Aquesta baixa freqüència de cèl·lules infectades en sang podria ser deguda a que tot i que l'HVH-8 és un virus limfotròpic, els limfòcits infectats es trobessin principalment localitzats en òrgans limfoides o altres teixits enlloc d'estar circulant en sang perifèrica. S'han descrit casos de SK post-trasplantament en individus prèviament HVH-8 seronegatius receptors de ronyó de donants seropositius, indicant que el ronyó podria ser un lloc de latència per l'HVH-8 [Parravicini et al, 1997; Sarid et al, 2001]. El fet que el virus de la mateixa subfamília HV γ 68 estableixi la latència en la melsa amb freqüències de cèl·lules infectades que varien segons la fase de la infecció reafirma aquesta hipòtesi [Weck et al, 1999].

Per últim, els valors més baixos de genomes per cèl·lula infectada (3 i 6 en els pacients 9 i 7, respectivament) són substancialment més petits que els observats en cèl·lules latentment infectades de la línia cel·lular BCBL-1 (de 50 a 100). Aquests resultats suggereixen que el nombre de genomes podria estar regulat de manera diferent en les PBMC latentment infectades *in vivo*, que en les cèl·lules transformades per l'HVH-8 derivades del PEL, com són les cèl·lules BCBL-1. Aquests resultats fan pensar que, probablement, l'HVH-8 sigui capaç de portar a terme diversos models de

latència, d'una manera similar al que fa el VEB. Aquest darrer virus, pot dur a terme quatre models de latència diferents definits pel patró d'expressió de proteïnes latents, algunes de les quals tenen activitat oncogènica i antiapoptòtica (LMP 1, EBNA 2 i EBNA 3C). La latència de tipus I (expressió de EBNA-1 i EBER) s'observa en el limfoma de Burkitt, la latència tipus II (expressió de EBNA-1, LMP-1 i -2, i EBER) en el carcinoma nasofaríngi i la malaltia de Hodgkin, i la latència tipus III (expressió de EBNA-1, -2 i -3, LMP-1 i -2, i EBER) en les línies cel·lulars transformades pel virus i la PTLD. Finalment, un quart model de latència amb expressió de LMP-2 i EBER s'observa en els limfòcits B infectats en sang perifèrica d'individus sans [Cohen, 2000]. Les diferents formes de latència estan associades a l'ús de promotors gènics diferents i reflecteixen els diferents tipus d'interacció entre el virus i la cèl·lula així com les diferents necessitats del virus d'envair o sobreviure en l'hoste humà [Kanegane et al, 2002]. Seria interessant poder estudiar el nombre de genomes per cèl·lula infectada per l'HVH-8 també en portadors sans d'aquest virus, els quals constitueixen el fenotip d'hoste infectat per l'HVH-8 majoritari; tanmateix, degut a la baixa freqüència de cèl·lules infectades en sang fins i tot en pacients amb SK, aquest estudi seria metodològicament molt complex.

3.2.6. Implicacions en el diagnòstic molecular

En pacients de SK associat al sida en la era de la HAART, les taxes de detecció del genoma de l'HVH-8 en PBMC per PCR varien entre el 30 i el 70% [Min i Katzenstein, 1999; Boivin et al, 1999; Campbell et al, 1999; Boivin et al, 2000; Boivin et al, 2002; Cannon i Pellett, 2002; Cannon et al, 2003]. No obstant això, segons els resultats obtinguts en el nostre estudi, la taxa de detecció depèn del volum de sang utilitzat, és a dir, del nombre de cèl·lules utilitzades per a l'extracció de DNA prèvia a la PCR. Assumint 6.6 pg de DNA per cèl·lula humana diploide i un rendiment mitjà de PBMC aïllades de 1.5×10^6 /ml de sang, el pacient PCR-positiu amb SK que tenia una

freqüència més baixa de cèl·lules infectades (pacient 8a) en va presentar una en 0.8 ml de sang (equivalent a uns 8 µg de DNA de PBMC). En altres paraules, agafant una alíquota de prop d'un ml de sang per a fer l'extracció de DNA i la PCR, segons la distribució de Poisson, només tindriem un 63% de probabilitats d'obtenir un resultat de PCR positiu. Per poder detectar la presència del genoma víric amb un 95% de probabilitats necessitariem fins a 2.4 ml de sang. Per altra banda, entre els pacients coinfectats sense SK PCR-positius per l'HVH-8, la freqüència més baixa (pacient 4) va ser d'una cèl·lula infectada en 2 ml de sang (aproximadament 30 µg de DNA), i per poder detectar la presència del genoma víric amb un 95% de probabilitats necessitariem fins a 6 ml de sang. En pacients amb un nombre alt de genomes vírics per cèl·lula infectada, seria necessària una quantitat menor de DNA de PBMC per obtenir un resultat de PCR positiu, sempre i quan el lisat cel·lular inicial partís d'un nombre de PBMC prou gran com per incloure com a mínim una cèl·lula infectada. Per altra banda, per poder detectar amb seguretat el virus en sang de pacients amb càrregues víriques per cèl·lula infectada menors (p.e. el pacient 9, amb 3 còpies per cèl·lula infectada), seria necessari extreure DNA a partir d'un alt nombre de PBMC i utilitzar gran quantitat d'aquest DNA per realitzar la PCR. Per tant, la sensibilitat en la detecció del genoma de l'HVH-8 en sang no depèn només de la sensibilitat de la PCR sinó del nombre de PBMC lisades inicialment, el nombre de genomes vírics per cèl·lula infectada i la quantitat de DNA utilitzada en la PCR. Per exemple, en l'estudi longitudinal d'un grup més ampli de pacients coinfectats pel VIH i l'HVH-8, es va veure que en molts casos la detecció del DNA de l'HVH-8 en PBMC era intermitent, fins i tot en pacients amb SK [Laney et al, 2004]. Aquest fet podria haver estat degut a que només es van utilitzar 600 ng de DNA de PBMC per realitzar la PCR i, per tant, alguns dels resultats negatius podrien estar indicant freqüències de cèl·lules infectades per sota d'una en 100.000. A partir del nostre estudi, es poden inferir les condicions necessàries per a una detecció fiable del genoma de l'HVH-8 en PBMC a partir de mostres de sang en pacients coinfectats amb el VIH (vegeu Annex 3).

En els estudis publicats fins ara i que han presentat baixes taxes de detecció, s'han utilitzat quantitats de DNA de 0.2 a 3.3 µg per reacció de PCR (de 3×10^4 a 5×10^5 PBMC), i no s'han avaluat més d'un o dos replicats. Per exemple, en un estudi que va detectar el genoma víric en un 50% de 16 pacients amb SK associat a la sida [Campbell et al, 1999], es va partir de 3 milions de PBMC per a l'extracció del DNA i es van utilitzar 2 µg d'aquest DNA per reacció de PCR. Abans del treball desenvolupat en aquesta tesi, hauríem considerat que tant el nombre de PBMC com la quantitat de DNA utilitzats per a la detecció del virus en sang per PCR eren elevats. No obstant això, els resultats presentats fan evident que hi hauria hagut un nombre insuficient de PBMC i massa poques alíquotes testades per PCR per tal de detectar el virus en alguns dels pacients que van resultar PCR-positius en el nostre estudi. Per altra banda, en les publicacions rarament es fa referència al nombre de PBMC a partir del qual es realitza l'extracció de DNA, quan aquesta variable és crucial per poder comparar les taxes de detecció obtingudes en els diversos estudis. Nosaltres hem utilitzat una mitja de 1.6×10^5 PBMC en cadascun de 12 replicats, arribant a un total de 13 µg de DNA de PBMC. Tot i això, tres dels nou pacients diagnosticats de SK van ser PCR negatius en el nostre estudi. Per altra banda, el pacient 4 va passar de negatiu a positiu quan es va augmentar el nombre de replicats de 12 a 22 i, per tant, els altres pacients negatius haurien pogut resultar també positius si s'hagués disposat d'un volum de sang més gran. A la llum dels resultats obtinguts, podem concloure que els resultats publicats fins ara sobre les taxes de detecció de l'HVH-8 en sang de pacients amb SK s'haurien d'interpretar amb certes reserves degut a les seves limitacions metodològiques.

Si ens plantejem quina mostra clínica seria millor per a la detecció del genoma de l'HVH-8 en sang, el nostre estudi indica que la taxa de detecció en PBMC sol ser més elevada que en plasma. S'ha de tenir en compte que l'HVH-8 està fonamentalment en estat latent, fins i tot en les lesions de SK, i per tant està associat a la fracció de cèl·lules. Només el trobarem lliure en el

plasma com a fruit de la infecció productiva i lisi de les cèl·lules infectades. En el nostre estudi, tres dels cinc pacients amb lesions de SK, tres de quatre pacients amb SK resolt, i un (dos si s'inclou el pacient pel qual es va utilitzar 22 replicats enlloc de 12) de quatre pacients d'alt risc pel SK van ser positius per PCR en les PBMC. En canvi, només dos dels cinc pacients amb lesions de SK i un dels quatre pacients amb SK resolt van ser positius en plasma. S'ha de tenir en compte, però, que aquesta menor taxa de detecció en plasma podria estar donada en part per una qüestió de volums: mentre es va utilitzar un nombre de PBMC corresponent a 0.4 - 2.1 ml de sang, només es van utilitzar 200 µl de plasma, que corresponen aproximadament a 0.4 ml de sang. De fet, alguns dels estudis que han detectat el virus en el plasma han utilitzat tècniques de concentració per centrifugació prèvies a l'extracció de DNA del plasma [Whitby et al, 1995; Broccolo et al, 2002], fet que indica que el virus és poc abundant. De fet, un parell d'estudis van trobar que el DNA en plasma només era positiu quan la càrrega vírica en PBMC era elevada [Harrington et al, 1996; Boivin et al, 2002]. Campbell *et al.*, en estudiar pacients de sida a Zimbabwe, van trobar una major taxa de detecció del genoma de l'HVH-8 en plasma concentrat que en cèl·lules, però mentre la càrrega vírica en PBMC es correlacionava amb l'estat clínic dels pacients, la càrrega vírica en plasma no ho feia [Campbell et al, 2000]. Per altra banda, Tedeschi *et al.* van trobar que la càrrega vírica en plasma sense concentrar era més elevada que en cèl·lules, i que es correlacionava amb la càrrega vírica del VIH i amb el títol d'anticossos enfront d'antígens lítics de l'HVH-8 en pacients en fases avançades de SK [Tedeschi et al, 2001]. Més recentment, en l'estudi longitudinal de la càrrega vírica en sèrum en pacients coinfectats per l'HVH-8 i el VIH que van desenvolupar SK, no es va trobar cap correlació ni amb la progressió cap a SK ni amb l'estadi de la malaltia [Polstra et al, 2004]. És prou evident que comparar els resultats dels diferents estudis resulta complicat quan les condicions utilitzades tant pel que fa a la quantitat de cèl·lules com de volum de plasma utilitzats són tan diverses.

3.3. Limitacions i dificultats associades a l'estudi

En aquesta tesi hem realitzat dos estudis transversals. A diferència dels estudis longitudinals, aquests aporten avantatges molt importants com són el temps requerit i els costos, que estan directament relacionades amb la viabilitat dels projectes de recerca. Per altra banda, els estudis longitudinals permeten una millor descripció de les associacions trobades, així com de la seva direccionalitat i, per tant, solen ser més informatius. De totes maneres, hem analitzat els resultats de forma lògica d'acord amb la bibliografia disponible sobre el tema.

En l'estudi de la virèmia per l'HVH-8, vam poder obtenir mostres d'un parell de pacients en dos moments diferents, la qual cosa ens va fer possible veure canvis en l'activitat vírica en qüestió de pocs mesos. Com a continuació d'aquest estudi, hauria estat interessant poder seguir aquells pacients de risc (coïnfectats pel VIH i l'HVH-8) fins al desenvolupament del SK per tenir una millor idea de l'evolució de l'activitat vírica. Cal tenir en compte, però, que la incidència de SK en individus coïnfectats que estan en HAART és relativament baixa i, per tant, hauria estat necessari el seguiment de varis centenars d'individus durant uns cinc anys per tal de poder identificar uns pocs casos incidents.

Una de les principals dificultats associades a aquest estudi va ser el reclutament de pacients infectats per l'HVH-8, amb i sense SK. Els pacients inclosos estaven participant en un estudi longitudinal més ampli en el qual eren citats segons un calendari establert [Cannon et al, 2003; Laney et al, 2004]. Quan el nostre projecte va començar, s'estaven duent a terme les darreres visites als participants, i alguns d'ells havien finalitzat el seguiment per mort o d'altres causes. En el cas que la impossibilitat d'incloure els pacients en fases més avançades de la malaltia a causa de la seva mort hagués derivat en un biaix de selecció, i tenint en compte que els pacients amb SK més avançat tendeixen a presentar el genoma de l'HVH-8 en sang

amb una freqüència relativament major, podríem hipotetitzar que en alguns pacients el genoma d'aquest virus es podria trobar en freqüències més elevades de les que hem descrit pels pacients inclosos en aquest estudi.

Un altre factor limitant va ser el volum de sang recollida. Per a l'anomenat estudi longitudinal es recollien mostres de sang de fins a 20 ml, entre altres mostres clíniques. Després de passar l'aprovació pel *Institutional Review Board* (IRB), es va poder recollir un volum de sang addicional per a realitzar aquest estudi, que va ser variable i en la majoria de casos molt limitat (4-20ml). A més, la majoria de pacients estaven en fases avançades d'infecció pel VIH i, per tant, presentaven recomptes de PBMC per ml de sang molt baixos. Cal tenir en compte també que, degut a la baixa freqüència de l'HVH-8 en les PBMC, es necessitava un elevat nombre de cèl·lules per poder detectar el virus. Això va provocar l'exclusió d'alguns pacients pels quals no es disposava de prou cèl·lules com per realitzar el LDA. Si haguéssim disposat d'un volum de sang major, haguéssim pogut definir millor quines eren les freqüències en els pacients que van resultar PCR negatius sota les condicions emprades.

Una de les dificultats més grans associades a aquest projecte va ser la de desenvolupar un mètode de LDA-PCR d'alta sensibilitat. La necessitat de treballar amb una elevada quantitat de DNA de PBMC per reacció de PCR va comportar el refinament de les condicions d'aïllament i lisi de les cèl·lules per tal de minimitzar les possibles inhibicions per part de l'hemoglobina, els components cel·lulars o els reactius de lisi. Així mateix, la gran diferència entre el nombre de còpies del gen cel·lular de la RNasa P i del genoma de l'HVH-8, tan poc abundant en les mostres clíniques, va suposar un llarg procés d'optimització fina de les condicions de PCR en temps real per a poder quantificar acurada i simultàniament les dues dianes. Una vegada acabat el procés d'optimització, tots els controls realitzats ens van indicar que la tècnica permetia determinar les freqüències de l'HVH-8 en PBMC de manera acurada.

4. CONCLUSIONS

Conclusions relacionades amb la taxa d'infecció i rutes de transmissió de l'HVH-8 en nens, en comparació del VEB:

1. En zones no endèmiques per l'HVH-8, com Alemanya i Geòrgia, s'observen baixes, però no despreciables taxes de seroprevalença per a aquest virus en els grups d'edat compresos entre els 6 mesos i els 17 anys, tot i que la prevalença en aquests grups és significativament menor a l'observada en zones endèmiques, com ara Nigèria.
2. A diferència de Nigèria, no ha estat possible detectar un augment de la prevalença de l'HVH-8 amb l'edat en les dues zones no endèmiques estudiades, probablement a causa de la baixa prevalença observada i el tamany de mostra utilitzat. No obstant això, la via de transmissió horitzontal de l'HVH-8, tot i no ser tan eficient com per al VEB, també pot tenir lloc en zones no endèmiques, fent possible que la infecció primària tingui lloc abans d'arribar a l'edat sexualment activa.
3. La seroprevalença del VEB és substancialment més gran a la de l'HVH-8 en les tres regions estudiades, i presenta una tendència creixent amb l'edat, reflectint la presència de transmissió horitzontal.
4. La resposta serològica enfront de l'HVH-8 en zones endèmiques és més completa (incloent-hi la presència d'anticossos enfront de diversos antigens, tant lítics com latents), i els títols d'anticossos, tant enfront de l'HVH-8 com el VEB, són més elevats.
5. L'IFA, realitzat segons la metodologia descrita, és la tècnica serològica que permet detectar millor els individus infectats per l'HVH-8 en la població infantil i adolescent, tant en zones endèmiques com no

endèmiques per aquest virus. No obstant això, és important utilitzar algoritmes de diversos assaigs serològics enfront de diferents antígens vírics per poder assolir una sensibilitat més alta a l'hora de detectar la infecció per l'HVH-8.

6. Els resultats de prevalença obtinguts per l'HVH-8 no són fruit de reaccions creuades amb el VEB en els assaigs serològics utilitzats.

Conclusions relacionades amb la virèmia en la infecció per l'HVH-8 i del seu paper en la patogènia del SK:

1. El mètode dissenyat ha permès establir que la proporció de cèl·lules infectades per l'HVH-8 entre les PBMC és relativament baixa, fins i tot en pacients amb sarcoma de Kaposi actiu (fins a menys d'una en 6 milions). Tanmateix, aquesta proporció varia entre individus i pot canviar en el decurs de la malaltia en un mateix individu.
2. El tipus de mostra escollida i el moment de recollida són decisius a l'hora de detectar el genoma víric en sang. L'HVH-8 es troba principalment infectant les PBMC, i en concret els limfòcits B (les cèl·lules infectades són més freqüents entre els limfòcits B que entre la resta de PBMC).
3. Les baixes taxes de detecció de l'HVH-8 en sang presentades fins ara en la literatura es deuen al fet que, en alguns casos, el volum de sang i la quantitat de DNA de PBMC utilitzats normalment en les reaccions de PCR han estat insuficients per a la detecció del virus, ja que tant la freqüència de PBMC infectades com la càrrega vírica són menors a les observades en altres infeccions víriques, com en el cas del VEB.

4. La detecció de l'HVH-8 en PBMC ha estat més habitual entre pacients amb SK, els quals tendeixen a presentar freqüències de cèl·lules infectades més elevades. Tot i això, la presència de lesions no sempre va acompanyada de la detecció del virus en sang.
5. En els pacients HVH-8 seropositius, amb o sense SK, que presenten resultats de PCR negatius, la freqüència de PBMC infectades pot estar per sota del límit de detecció.
6. Els valors obtinguts de genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada, juntament amb la detecció del virus en plasma en alguns pacients, indiquen que, si bé les PBMC presenten normalment una infecció latent, l'HVH-8 pot dur a terme també el cicle lític en un percentatge de les cèl·lules. Per tant, és plausible que aquestes PBMC líticament infectades contribueixin a la disseminació del virus cap a dianes endotelials contribuint a la patogènia del SK. Tot i això, els baixos valors de virèmia observats indiquen que el paper d'aquesta en la patogènia del SK pot no ser tan significatiu com en el cas de certes neoplàsies associades al VEB.
7. El nombre de genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada pot arribar a ser més baix en les PBMC dels pacients estudiats que en les cèl·lules BCBL-1 latentment infectades. Per tant, la latència en els limfòcits *in vivo* i en cèl·lules de limfoma transformades per l'HVH-8 podria estar regulada de manera diferent, com és el cas dels diferents tipus de latència del VEB.

5. BIBLIOGRAFIA

Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE Jr., Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:439-64.

Albini A, Morini M, D'Agostini F, Ferrari N, Campelli F, Arena G, et al. Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. *Cancer Res.* 2001;61:8171-8.

Ambroziak JA, Blackbourn DJ, Herndier BG, Glogau RG, Gullett JH, McDonald AR, et al. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science.* 1995;268:582-3.

Anderson JE, Wilson RW, Barker P, Doll L, Jones TS, Holtgrave D. Prevalence of sexual and drug-related HIV risk behaviors in the U.S. adult population: results of the 1996 National Household Survey on Drug Abuse. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21:148-56.

Andreoni M, El-Sawaf G, Rezza G, Ensoli B, Nicastrì E, Ventura L, et al. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:465-9.

Andreoni M, Sarmati L, Nicastrì E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, et al. Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. *JAMA.* 2002;287:1295-300.

Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 2000;342:1027-38.

Ariyoshi K, Schim vdL, Cook P, Whitby D, Corrah T, Jaffar S, et al. Kaposi's sarcoma in the Gambia, West Africa is less frequent in human immunodeficiency virus type 2 than in human immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of human herpesvirus 8. *J Hum Virol.* 1998;1:193-9.

Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 1997;385:347-50.

Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med*. 1999;190:567-76.

Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*. 1999;284:641-4.

Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:7941-5.

Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alu M, Sarid R, et al. Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. *Nat Med*. 2003;9:554-61.

Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*. 1990;335:123-8.

Beral V, Newton R, Sitas F. Human herpesvirus 8 and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1440-1.

Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Bocker J, Lennette ET, Henle G. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int J Cancer*. 1978;22:239-43.

Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis.* 2000;181:1562-8.

Biggar RJ, Engels EA, Whitby D, Kedes DH, Goedert JJ. Antibody reactivity to latent and lytic antigens to human herpesvirus-8 in longitudinally followed homosexual men. *J Infect Dis.* 2003;187:12-8.

Bigoni B, Dolcetti R, de Lellis L, Carbone A, Boiocchi M, Cassai E, et al. Human herpesvirus 8 is present in the lymphoid system of healthy persons and can reactivate in the course of AIDS. *J Infect Dis.* 1996;173:542-9.

Blackbourn DJ, Ambroziak J, Lennette E, Adams M, Ramachandran B, Levy JA. Infectious human herpesvirus 8 in a healthy North American blood donor. *Lancet.* 1997;349:609-11.

Blackbourn DJ, Lennette E, Klencke B, Moses A, Chandran B, Weinstein M, et al. The restricted cellular host range of human herpesvirus 8. *AIDS.* 2000;14:1123-33.

Blasig C, Zietz C, Haar B, Neipel F, Esser S, Brockmeyer NH, et al. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol.* 1997;71:7963-8.

Blauvelt A. The role of human herpesvirus 8 in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Adv Dermatol.* 1999;14:167-206.

Blauvelt A, Sei S, Cook PM, Schulz TF, Jeang KT. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. *J Infect Dis.* 1997;176:771-4.

Boivin G, Gaudreau A, Toma E, Lalonde R, Routy JP, Murray G, et al. Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects: correlation with the presence of Kaposi's sarcoma and response to anticytomegalovirus therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:377-80.

Boivin G, Gaudreau A, Routy JP. Evaluation of the human herpesvirus 8 DNA load in blood and Kaposi's sarcoma skin lesions from AIDS patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000;14:1907-10.

Boivin G, Cote S, Cloutier N, Abed Y, Maguigad M, Routy JP. Quantification of human herpesvirus 8 by real-time PCR in blood fractions of AIDS patients with Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *J Med Virol*. 2002;68:399-403.

Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, Graham AK, Fisher C, Thomas A, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nat Med*. 1995;1:1274-8.

Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, et al. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*. 1997;278:290-4.

Boshoff C, Gao SJ, Healy LE, Matthews S, Thomas AJ, Coignet L, et al. Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood*. 1998;91:1671-9.

Bourbouliia D, Whitby D, Boshoff C, Newton R, Beral V, Carrara H, et al. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *JAMA*. 1998;280:31-2.

Bourbouliia D, Aldam D, Lagos D, Allen E, Williams I, Cornforth D, et al. Short- and long-term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune responses and viremia. *AIDS*. 2004;18:485-93.

Brenner B, Weissmann-Brenner A, Rakowsky E, Weltfriend S, Fenig E, Friedman-Birnbaum R, et al. Classical Kaposi sarcoma: prognostic factor analysis of 248 patients. *Cancer*. 2002;95:1982-7.

Broccolo F, Locatelli G, Sarmati L, Piergiovanni S, Veglia F, Andreoni M, et al. Calibrated real-time PCR assay for quantitation of human herpesvirus 8 DNA in biological fluids. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4652-8.

Browning PJ, Sechler JM, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, et al. Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. *Blood.* 1994;84:2711-20.

Calabro ML, Sheldon J, Favero A, Simpson GR, Fiore JR, Gomes E, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J Human Virol.* 1998;1:207-13.

Calabro ML, Gasperini P, Barbierato M, Ometto L, Zanchetta M, De Rossi A, et al. A search for human herpesvirus 8 (HHV-8) in HIV-1 infected mothers and their infants does not suggest vertical transmission of HHV-8. *Int J Cancer.* 2000;85:296-7.

Campbell TB, Fitzpatrick L, MaWhinney S, Zhang X, Schooley RT. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) infection in men receiving treatment for HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;22:333-40.

Campbell TB, Borok M, Gwanzura L, MaWhinney S, White IE, Ndemera B, et al. Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage. *AIDS.* 2000;14:2109-16.

Cannon MJ, Dollard SC, Smith DK, Klein RS, Schuman P, Rich JD, et al. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 2001;344:637-43.

Cannon MJ, Pellett PE. Effect of order of infection with human immunodeficiency virus and human herpesvirus 8 on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis.* 2001;183:1304.

Cannon MJ, Pellett PE. Relationship between Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and HIV. *JAMA.* 2002;287:1526-8.

Cannon MJ, Dollard SC, Black JB, Edlin BR, Hannah C, Hogan SE, et al. Risk factors for Kaposi's sarcoma in men seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *AIDS.* 2003;17:215-22.

Casabona J, Melbye M, Biggar RJ. Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in European AIDS cases. No excess risk of Kaposi's sarcoma in Mediterranean countries. *Int J Cancer.* 1991;47:49-53.

Cattani P, Capuano M, Graffeo R, Ricci R, Cerimele F, Cerimele D, et al. Kaposi's sarcoma associated with previous human herpesvirus 8 infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2001;39:506-8.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *New Engl J Med.* 1995;332:1186-91.

Cesarman E, Mesri EA, Gershengorn MC. Viral G protein-coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a model of paracrine neoplasia? *J Exp Med.* 2000;191:417-22.

Chan KH, Tam JS, Peiris JS, Seto WH, Ng MH. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy. *J Clin Virol.* 2001;21:57-62.

Chandran B, Bloomer C, Chan SR, Zhu L, Goldstein E, Horvat R. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology.* 1998a;249:140-9.

Chandran B, Smith MS, Koelle DM, Corey L, Horvat R, Goldstein E. Reactivities of human sera with human herpesvirus-8-infected BCBL-1 cells and identification of HHV-8-specific proteins and glycoproteins and the encoding cDNAs. *Virology*. 1998b;243:208-17.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266:1865-9.

Chang J, Renne R, Dittmer D, Ganem D. Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology*. 2000;266:17-25.

Chatlynne LG, Lapps W, Handy M, Huang YQ, Masood R, Hamilton AS, et al. Detection and titration of human herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*. 1998;92:53-8.

Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol*. 1999;9:175-85.

Chen J, Ueda K, Sakakibara S, Okuno T, Parravicini C, Corbellino M, et al. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic transactivator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:4119-24.

Chokunonga E, Levy LM, Bassett MT, Borok MZ, Mauchaza BG, Chirenje MZ, et al. Aids and cancer in Africa: the evolving epidemic in Zimbabwe. *AIDS*. 1999;13:2583-8.

Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92.

Corbellino M, Bestetti G, Scalapogna C, Calattini S, Galazzi M, Meroni L, et al. Long-term remission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-related

multicentric Castleman disease with anti-CD20 monoclonal antibody therapy. *Blood*. 2001;98:3473-5.

Corchero JL, Mar EC, Spira TJ, Pellett PE, Inoue N. Comparison of serologic assays for detection of antibodies against human herpesvirus 8. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:913-21.

Cotter MA, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology*. 1999;264:254-64.

Damania B. Oncogenic gamma-herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:656-68.

Decker LL, Shankar P, Khan G, Freeman RB, Dezube BJ, Lieberman J, et al. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med*. 1996;184:283-8.

Dedicoat M, Newton R. Review of the distribution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in Africa in relation to the incidence of Kaposi's sarcoma. *Br J Cancer*. 2003;88:1-3.

Diamond C, Brodie SJ, Krieger JN, Huang ML, Koelle DM, Diem K, et al. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 1998;72:6223-7.

Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:175-212.

Drexler HG, Uphoff CC, Gaidano G, Carbone A. Lymphoma cell lines: in vitro models for the study of HHV-8+ primary effusion lymphomas (body cavity-based lymphomas). *Leukemia*. 1998;12:1507-17.

Duckers N, Rezza G. Human herpesvirus 8 epidemiology: what we do and do not know. *AIDS* 2003;17:1717-30.

Duman S, Toz H, Asci G, Alper S, Ozkahya M, Unal I, et al. Successful treatment of post-transplant Kaposi's sarcoma by reduction of immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:892-6.

Dupin N, Diss TL, Kellam P, Tulliez M, Du MQ, Sicard D, et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood*. 2000;95:1406-12.

Engels EA, Whitby D, Goebel PB, Stossel A, Waters D, Pintus A, et al. Identifying human herpesvirus 8 infection: performance characteristics of serologic assays. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;23:346-54.

Engels EA, Biggar RJ, Marshall VA, Walters MA, Gamache CJ, Whitby D, et al. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS*. 2003;17:1847-51.

Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*. 1990;345:84-6.

Ensoli B, Sturzl M, Monini P. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2000;10:367-81.

Esteve A, Casabona C, González del Castillo J, González Lahoz J, Nájera R, Rodríguez A, et al. Sarcoma de Kaposi. Documento de Consenso. Madrid: Meditex; 2002.

European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS, WHO and UNAIDS Collaborating Centre on AIDS. HIV/AIDS Surveillance in Europe. End-year report 2002. EuroHIV. No 68. 2003.

Fakhari FD, Dittmer DP. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR. *J Virol.* 2002;76:6213-23.

Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn.* 2001;6:279-89.

Fiorelli V, Gendelman R, Sirianni MC, Chang HK, Colombini S, Markham PD, et al. gamma-Interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood.* 1998;91:956-67.

Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, Biggar RJ. Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *J Infect Dis.* 1979;139:553-8.

Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E. Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature.* 1998;394:588-92.

Foreman KE, Friborg JJ, Kong WP, Woffendin C, Poverini PJ, Nickoloff BJ, et al. Propagation of a human herpesvirus from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *New Engl J Med.* 1997;336:163-71.

Foreman KE, Friborg J, Chandran B, Katano H, Sata T, Mercader M, et al. Injection of human herpesvirus-8 in human skin engrafted on SCID mice induces Kaposi's sarcoma-like lesions. *J Dermatol Sci.* 2001;26:182-93.

Friedman-Kien AE, Laubenstein LJ, Rubinstein P, Buimovici-Klein E, Marmor M, Stahl R, et al. Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann Intern Med.* 1982;96:693-700.

Gambus G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, et al. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *AIDS*. 2001;15:1167-74.

Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, et al. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *New Engl J Med*. 1996a;335:233-41.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med*. 1996b;2:925-8.

Gessain A, Maucelere P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayouba A, Essame-Oyono JL, et al. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer*. 1999;81:189-92.

Goedert JJ, Biggar RJ, Melbye M, Mann DL, Wilson S, Gail MH, et al. Effect of T4 count and cofactors on the incidence of AIDS in homosexual men infected with human immunodeficiency virus. *JAMA*. 1987;257:331-4.

Goedert JJ. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. *Semin Oncol*. 2000;27:390-401.

Gotlieb-Stematsky T, Modan M, Meron I, Fogel A, Sayar Y, Leventon-Kriss S, et al. Transfer of viral antibodies from mother to infant. *Isr J Med Sci*. 1983;19:984-6.

Grandadam M, Dupin N, Calvez V, Gorin I, Blum L, Kernbaum S, et al. Exacerbations of clinical symptoms in human immunodeficiency virus type 1-infected patients with multicentric Castleman's disease are associated with a high increase in Kaposi's sarcoma herpesvirus DNA load in peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis*. 1997;175:1198-201.

Groves AK, Cotter MA, Subramanian C, Robertson ES. The latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates two major essential Epstein-Barr virus latent promoters. *J Virol.* 2001;75:9446-57.

Guillot B, Carles MJ, Foulongne V, Dereure O, Ramuz M. Lack of modification of virological status after chemotherapy or radiotherapy for classic Kaposi's sarcoma. *Br J Dermatol.* 2002;146:337-8.

Harrington WJJ, Bagasra O, Sosa CE, Bobroski LE, Baum M, Wen XL, et al. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in cell-free plasma and mononuclear cells of Kaposi's sarcoma patients. *J Infect Dis.* 1996;174:1101-5.

Hayward GS. KSHV strains: the origins and global spread of the virus. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:187-99.

Hengge UR, Ruzicka T, Tying SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:281-92.

Henke-Gendo C, Schulz TF. Transmission and disease association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: recent developments. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17:53-7.

Hermans P, Clumeck N, Picard O, Van Vooren JP, Duriez P, Zucman D, et al. AIDS-related Kaposi's sarcoma patients with visceral manifestations. Response to human chorionic gonadotropin preparations. *J Hum Virol.* 1998;1:82-9.

Herndier B, Ganem D. The biology of Kaposi's sarcoma. *Cancer Treat Res.* 2001;104:89-126.

Huang LM, Lee CY, Chang MH, Wang JD, Hsu CY. Primary infections of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus-6. *Arch Dis Child.* 1993;68:408-11.

Inoue N, Mar EC, Dollard SC, Pau CP, Zheng Q, Pellett PE. New immunofluorescence assays for detection of Human herpesvirus 8-specific antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7:427-35.

Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer.* 2000;88:500-17.

Jacobson LP, Jenkins FJ, Springer G, Munoz A, Shah KV, Phair J, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis.* 2000;181:1940-9.

Jenson HB. Infectious mononucleosis. En: Jenson HB, Baltimore RS, editors. *Pediatric Infectious Diseases: Principles and Practice.* Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co.; 2002. p. 426.

Kakoola DN, Sheldon J, Byabazaire N, Bowden RJ, Katongole-Mbidde E, Schulz TF, et al. Recombination in human herpesvirus-8 strains from Uganda and evolution of the K15 gene. *J Gen Virol.* 2001;82:2393-404.

Kanegane H, Nomura K, Miyawaki T, Tosato G. Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;44:239-49.

Kasolo FC, Mpabalwani E, Gompels UA. Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa. *J Gen Virol.* 1997;78:847-55.

Kasolo FC, Monze M, Obel N, Anderson RA, French C, Gompels UA. Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 12):3055-65.

Katano H, Iwasaki T, Baba N, Terai M, Mori S, Iwamoto A, et al. Identification of antigenic proteins encoded by human herpesvirus 8 and seroprevalence in the general population and among patients with and without Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 2000;74:3478-85.

Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. 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.* 1996;2:918-24.

Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis.* 1997;176:94-102.

Kowalzick L, Hoffmann I, Neipel F, Walter H, Schlehaider UK, Ponnighaus JM. Detection of HHV-8 DNA in a German patient with classical Kaposi's sarcoma may allow an estimation of the incubation period. *Eur J Dermatol.* 1998;8:432-4.

LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poiesz BJ. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infect Dis.* 1998;178:1610-5.

Lallemant F, Desire N, Rozenbaum W, Nicolas JC, Marechal V. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1404-8.

Lane BR, Liu J, Bock PJ, Schols D, Coffey MJ, Strieter RM, et al. Interleukin-8 and growth-regulated oncogene alpha mediate angiogenesis in Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 2002;76:11570-83.

Laney AS, Dollard SC, Jaffe HW, Offermann MK, Spira TJ, Gunthel CJ, et al. Repeated measures study of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA and antibodies in men seropositive for both HHV-8 and HIV. *AIDS*. 2004;18:1819-26.

Lebbe C, Agbalika F, de Cremoux P, Deplanche M, Rybojad M, Masgrau E, et al. Detection of human herpesvirus 8 and human T-cell lymphotropic virus type 1 sequences in Kaposi sarcoma. *Arch Dermatol*. 1997;133:25-30.

Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet*. 1996;348:858-61.

Lin JC, Lin SC, Mar EC, Pellett PE, Stamey FR, Stewart JA, et al. Is Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men? *Lancet*. 1995;346:1601-2.

Lin SF, Sun R, Heston L, Gradoville L, Shedd D, Haglund K, et al. Identification, expression, and immunogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded small viral capsid antigen. *J Virol*. 1997;71:3069-76.

Lukac DM, Renne R, Kirshner JR, Ganem D. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*. 1998;252:304-12.

Luppi M, Barozzi P, Santagostino G, Trovato R, Schulz TF, Marasca R, et al. Molecular evidence of organ-related transmission of kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients. *Blood*. 2000;96:3279-81.

Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *New Engl J Med*. 1998;338:948-54.

Martin JN, Osmond DH. Invited commentary: determining specific sexual practices associated with human herpesvirus 8 transmission. *Am J Epidemiol.* 2000;151:225-9.

Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, et al. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer.* 1998;77:817-20.

Melbye M, Cook PM, Hjalgrim H, Begtrup K, Simpson GR, Biggar RJ, et al. Risk factors for Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer.* 1998;77:543-8.

Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, et al. Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med.* 1996;183:2385-90.

Mesri EA. Inflammatory reactivation and angiogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/HHV8: a missing link in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma. *Blood.* 1999;93:4031-3.

Miller G, Rigsby MO, Heston L, Grogan E, Sun R, Metroka C, et al. Antibodies to butyrate-inducible antigens of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in patients with HIV-1 infection. *New Engl J Med.* 1996;334:1292-7.

Miller G, Heston L, Grogan E, Gradoville L, Rigsby M, Sun R, et al. Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol.* 1997;71:314-24.

Min J, Katzenstein DA. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in peripheral blood cells in human immunodeficiency virus infection: association with Kaposi's sarcoma, CD4 cell count, and HIV RNA levels. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999;15:51-5.

Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell*. 1995;80:593-601.

Mocroft A, Kirk O, Clumeck N, Gargalianos-Kakolyris P, Trocha H, Chentsova N, et al. The changing pattern of Kaposi sarcoma in patients with HIV, 1994-2003: the EuroSIDA Study. *Cancer*. 2004;100:2644-54.

Monini P, de Lellis L, Fabris M, Rigolin F, Cassai E. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *New Engl J Med*. 1996;334:1168-72.

Monini P, Carlini F, Sturzl M, Rimessi P, Superti F, Franco M, et al. Alpha interferon inhibits human herpesvirus 8 (HHV-8) reactivation in primary effusion lymphoma cells and reduces HHV-8 load in cultured peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*. 1999a;73:4029-41.

Monini P, Colombini S, Sturzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, et al. Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood*. 1999b;93:4044-58.

Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 1996;70:549-58.

Moore PS, Chang Y. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 495-514.

Moses AV, Jarvis MA, Raggio C, Bell YC, Ruhl R, Luukkonen BG, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced upregulation of the c-kit proto-oncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells. *J Virol*. 2002;76:8383-99.

Nasti G, Martellotta F, Berretta M, Mena M, Fasan M, Di Perri G, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the presenting features and outcome of patients with acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi sarcoma. *Cancer*. 2003;98:2440-6.

Nealon K, Newcomb WW, Pray TR, Craik CS, Brown JC, Kedes DH. Lytic replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus results in the formation of multiple capsid species: isolation and molecular characterization of A, B, and C capsids from a gammaherpesvirus. *J Virol*. 2001;75:2866-78.

Neipel F, Albrecht JC, Ensser A, Huang YQ, Li JJ, Friedman-Kien AE, et al. Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol*. 1997;71:839-42.

O'Brien TR, Kedes D, Ganem D, Macrae DR, Rosenberg PS, Molden J, et al. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis*. 1999;180:1010-7.

O'Neill E, Douglas JL, Chien ML, Garcia JV. Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate- and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line. *J Virol*. 1997;71:4791-7.

Parkin DM, Wabinga H, Nambooze S, Wabwire-Mangen F. AIDS-related cancers in Africa: maturation of the epidemic in Uganda. *AIDS*. 1999;13:2563-70.

Parravicini C, Olsen SJ, Capra M, Poli F, Sirchia G, Gao SJ, et al. Risk of Kaposi's sarcoma-associated herpes virus transmission from donor allografts among Italian posttransplant Kaposi's sarcoma patients. *Blood*. 1997;90:2826-9.

Parravicini C, Chandran B, Corbellino M, Berti E, Paulli M, Moore PS, et al. Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-

infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol.* 2000;156:743-9.

Pau CP, Lam LL, Spira TJ, Black JB, Stewart JA, Pellett PE, et al. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1574-7.

Pauk J, Huang ML, Brodie SJ, Wald A, Koelle DM, Schacker T, et al. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med.* 2000;343:1369-77.

Pellett PE, Spira TJ, Bagasra O, Boshoff C, Corey L, de Lellis L, et al. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 8 DNA in semen. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1298-301.

Pellet C, Chevret S, Blum L, Gauville C, Hurault M, Blanchard G, et al. Virologic and immunologic parameters that predict clinical response of AIDS-associated Kaposi's sarcoma to highly active antiretroviral therapy. *J Invest Dermatol.* 2001;117:858-63.

Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, et al. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion.* 2003;43:1260-8.

Picchio GR, Sabbe RE, Gulizia RJ, McGrath M, Herndier BG, Mosier DE. The KSHV/HHV8-infected BCBL-1 lymphoma line causes tumors in SCID mice but fails to transmit virus to a human peripheral blood mononuclear cell graft. *Virology.* 1997;238:22-9.

Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Tregouet D-A, Joubert M, Tortevoeye P, et al. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet.* 2000;356:1062-5.

Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Gessain A. High titers of anti-human herpesvirus 8 antibodies in elderly males in an endemic population. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1333-5.

Polstra AM, Goudsmit J, Cornelissen M. Latent and lytic HHV-8 mRNA expression in PBMCs and Kaposi's sarcoma skin biopsies of AIDS Kaposi's sarcoma patients. *J Med Virol.* 2003;70:624-7.

Polstra AM, Cornelissen M, Goudsmit J, van der Kuyl AC. Retrospective, longitudinal analysis of serum human herpesvirus-8 viral DNA load in AIDS-related Kaposi's sarcoma patients before and after diagnosis. *J Med Virol.* 2004;74:390-6.

Quinlivan EB, Zhang C, Stewart PW, Komoltri C, Davis MG, Wehbie RS. Elevated virus loads of Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus 8 predict Kaposi's sarcoma disease progression, but elevated levels of human immunodeficiency virus type 1 do not. *J Infect Dis.* 2002;185:1736-44.

Qunibi W, Al-Furayh O, Almeshari K, Lin SF, Sun R, Heston L, et al. Serologic association of human herpesvirus eight with posttransplant Kaposi's sarcoma in Saudi Arabia. *Transplantation.* 1998;65:583-5.

Raab MS, Albrecht JC, Birkmann A, Yaguboglu S, Lang D, Fleckenstein B, et al. The immunogenic glycoprotein gp35-37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J Virol.* 1998;72:6725-31.

Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI, Chatlynne L, et al. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. HHV-8 Interlaboratory Collaborative Group. *J Infect Dis.* 1998;178:304-9.

Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, et al. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med.* 1996;2:342-6.

Renne R, Blackbourn D, Whitby D, Levy J, Ganem D. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol.* 1998;72:5182-8.

Renwick N, Halaby T, Weverling GJ, Dukers NHTM, Simpson GR, Coutinho RA, et al. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS.* 1998;12:2481-8.

Rezza G, Andreoni M, Dorrucchi M, Pezzotti P, Monini P, Zerboni R, et al. Human herpesvirus 8 seropositivity and risk of Kaposi's sarcoma and other acquired immunodeficiency syndrome-related diseases. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1468-74.

Rezza G, Dorrucchi M, Serraino D, Andreoni M, Giuliani M, Zerboni R, et al. Incidence of Kaposi's sarcoma and HHV-8 seroprevalence among homosexual men with known dates of HIV seroconversion. Italian Seroconversion Study. *AIDS.* 2000;14:1647-53.

Rezza G, Capobianchi M, Serraino D, Peroni M, Piselli P, Calcaterra S, et al. HHV-8 shedding among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;28:103-4.

Rodrigo AG, Goracke PC, Rowhanian K, Mullins JI. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997;13:737-42.

Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, et al. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1612-5.

Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis.* 2001;3:79-87.

Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:14862-7.

Sakurada S, Katano H, Sata T, Ohkuni H, Watanabe T, Mori S. Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. *J Virol*. 2001;75:7717-22.

Sarid R, Olsen SJ, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv Virus Res*. 1999;52:139-232.

Sarid R, Pizov G, Rubinger D, Backenroth R, Friedlaender MM, Schwartz F, et al. Detection of human herpesvirus-8 DNA in kidney allografts prior to the development of Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1502-5.

Schatz O, Monini P, Bugarini R, Neipel F, Schulz TF, Andreoni M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serology in Europe and Uganda: multicentre study with multiple and novel assays. *J Med Virol*. 2001;65:123-32.

Schulz TF. Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *Adv Cancer Res*. 1999;76:121-60.

Schulz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45 Suppl T3:15-27.

Schwartz RA. Kaposi's sarcoma: advances and perspectives. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:804-14.

Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, et al. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. *Nat Med*. 2002;8:225-32.

Simas JP, Efstathiou S. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1998;6:276-82.

Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet.* 1996;348:1133-8.

Sirianni MC, Vincenzi L, Fiorelli V, Topino S, Scala E, Uccini S, et al. gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages. *Blood.* 1998;91:968-76.

Sirianni MC, Vincenzi L, Topino S, Giovannetti A, Mazzetta F, Libi F, et al. NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon highly active antiretroviral therapy in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur J Immunol.* 2002;32:2711-20.

Smith MS, Bloomer C, Horvat R, Goldstein E, Casparian JM, Chandran B. Detection of human herpesvirus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. *J Infect Dis.* 1997;176:84-93.

Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, Cacoub P, Cazals-Hatem D, Babinet P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemann's disease. *Blood.* 1995;86:1276-80.

Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng Y-X, Pau C-P, Black JB, et al. Comparison of serologic assays and PCR for the diagnosis of human herpesvirus 8 (HHV-8) infection. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2174-80.

Stamey FR, Patel MM, Holloway BP, Pellett PE. Quantitative, fluorogenic probe PCR assay for detection of human herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3537-40.

Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virol.* 1997;71:715-9.

Stevenson PG, Doherty PC. Kinetic analysis of the specific host response to a murine gammaherpesvirus. *J Virol.* 1998;72:943-9.

Tedeschi R, Caggiari L, Silins I, Kallings I, Andersson-Ellstrom A, De Paoli P, et al. Seropositivity to human herpesvirus 8 in relation to sexual history and risk of sexually transmitted infections among women. *Int J Cancer.* 2000;87:232-5.

Tedeschi R, Enbom M, Bidoli E, Linde A, De Paoli P, Dillner J. Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4269-73.

Tedeschi R, Dillner J, De Paoli P. Laboratory diagnosis of human herpesvirus 8 infection in humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21:831-44.

Trippler M, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods.* 1999;78:129-47.

University of Washington [pàgina d'internet]. Washington: QUALITY. Mullins Molecular Retrovirology Lab [actualitzat 2001; citat 2004]. Disponible en: <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/quality/jquality.htm>.

Varthakavi V, Browning PJ, Spearman P. Human immunodeficiency virus replication in a primary effusion lymphoma cell line stimulates lytic-phase replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.* 1999;73:10329-38.

Verma SC, Robertson ES. Molecular biology and pathogenesis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;222:155-63.

Vieira J, Huang ML, Koelle DM, Corey L. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 1997;71:7083-7.

Viviano E, Vitale F, Ajello F, Perna AM, Villafrate MR, Bonura F, et al. Human herpesvirus type 8 DNA sequences in biological samples of HIV-positive and negative individuals in Sicily. *AIDS.* 1997;11:607-12.

Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Mugerwa JW. Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int J Cancer.* 1993;54:26-36.

Wang QJ, Jenkins FJ, Jacobson LP, Kingsley LA, Day RD, Zhang ZW, et al. Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8⁺ T-cell response to viral lytic cycle proteins. *Blood.* 2001;97:2366-73.

Weck KE, Kim SS, Virgin HW, IV, Speck SH. B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency. *J Virol.* 1999;73:4651-61.

Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet.* 1995;346:799-802.

Whitby D, Luppi M, Barozzi P, Boshoff C, Weiss RA, Torelli G. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:395-7.

Whitby D, Luppi M, Sabin C, Barozzi P, Di Biase AR, Balli F, et al. Detection of antibodies to human herpesvirus 8 in Italian children: evidence for horizontal transmission. *Br J Cancer.* 2000;82:702-4.

Wilkinson J, Cope A, Gill J, Bourboulia D, Hayes P, Imami N, et al. Identification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes and evaluation of reconstitution of KSHV-specific responses in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2002;76:2634-40.

Yang J, Tao Q, Flinn IW, Murray PG, Post LE, Ma H, et al. Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood.* 2000;96:4055-63.

Yu Y, Black JB, Goldsmith CS, Browning PJ, Bhalla K, Offermann MK. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *J Gen Virol.* 1999;80:83-90.

Ziegler JL. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet.* 1993;342:1348-51.

Ziegler JL, Katongole-Mbidde E. Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int J Cancer.* 1996;65:200-3.

Zong J, Ciufo DM, Viscidi R, Alagiozoglou L, Tying S, Rady P, et al. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism. *J Clin Virol.* 2002;23:119-48.

Comparison of Human Herpesvirus 8 and Epstein–Barr Virus Seropositivity Among Children in Areas Endemic and Non-Endemic for Kaposi’s Sarcoma

E. Martro,^{1,2} M. Bulterys,³ J.A. Stewart,¹ T.J. Spira,⁴ M.J. Cannon,¹ T.D. Thacher,⁵ R. Bruns,⁶ P.E. Pellett,¹ and S.C. Dollard^{1*}

¹Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia

²Microbiology Service, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

³Division of HIV/AIDS Prevention, CDC, Atlanta, Georgia

⁴Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research, CDC, Atlanta, Georgia

⁵Department of Family Medicine, Jos University Teaching Hospital, Jos, Nigeria

⁶University Children’s Hospital, Ernst-Moritz-Arndt-University, Greifswald, Germany

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is the etiologic agent of Kaposi’s sarcoma (KS). Several studies indicate horizontal HHV-8 transmission among children in areas where KS is endemic, but few studies have assessed acquisition of HHV-8 by children in low seroprevalence areas. Antibody screening was carried out for HHV-8 and Epstein–Barr virus (EBV) on 787 serum specimens from children living in two areas where HHV-8 is not endemic, the United States (US) and Germany, and on 184 specimens from children living in a KS-endemic area (Nigeria). For children in the US and Germany, the results showed low HHV-8 seroprevalence rates (3–4%). However, US children aged 6 months to 5 years had higher HHV-8 antibody titers than did 6–17-year-old children ($P < 0.01$), a finding consistent with more recent infections being detected in the younger children. Compared with seroprevalence rates and antibody titers in US and German children, those in Nigerian children were significantly higher, and seroprevalence increased with age. There was no evidence of cross-reactivity between assays for HHV-8 and EBV, despite the genetic similarity of these two herpesviruses. The data indicate that HHV-8 transmission among children where HHV-8 is not endemic occurs, but is uncommon. The findings also suggest that HHV-8 antibodies, as measured by current tests, may not persist for long periods in populations at low risk for KS and that vertical transmission is rare, although longitudinal studies are necessary to address directly these issues. **J. Med. Virol. 72:126–131, 2004.**

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HHV-8; EBV; KSHV (Kaposi’s sarcoma-associated herpes-

virus); seroprevalence; epidemiology

INTRODUCTION

Human herpesvirus 8 (HHV-8), also known as Kaposi’s sarcoma (KS)-associated herpesvirus is a gammaherpesvirus that is the etiologic agent of all forms of KS. Among them, epidemic KS is the most common malignancy in patients infected with human immunodeficiency virus [Antman and Chang, 2000; Iscovich et al., 2000], although its incidence has decreased in industrialized countries with the availability of effective antiretroviral therapies [Eltom et al., 2002]. Endemic KS is found in regions of Africa and is a common, debilitating cancer among men, women, and children [Chokunonga et al., 1999; Parkin et al., 1999].

Serologic studies around the world suggest that HHV-8 is not as prevalent as the other human herpesviruses. Estimates of adult HHV-8 seroprevalence vary according to assays and algorithms used, ranging from 2–10% in Northern Europe and the United States (US) to 10–30% in Southern Europe and over 50% in some parts

We dedicate this paper to the memory of our co-author, colleague, and friend Dr. John A. Stewart, who died in June, 2003.

P.E. Pellett’s present address is Department of Molecular Biology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH.

Grant sponsor: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

*Correspondence to: Dr S.C. Dollard, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE, Mailstop G18, Atlanta, GA 30333. E-mail: sgd5@cdc.gov

Accepted 24 July 2003

DOI 10.1002/jmv.10548

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

of Africa. Limited epidemiologic studies in the US and Europe show seroprevalence rates of 0–4% in children [Lennette et al., 1996; Blauvelt et al., 1997; Chandran et al., 1998b]. HHV-8 seroprevalence in young children is higher in KS-endemic areas such as Italy [Whitby et al., 2000], and highest in regions of Africa where HHV-8 seroprevalence increases with age and can reach adult levels before puberty [Bourbouliou et al., 1998; Mayama et al., 1998; Andreoni et al., 1999]. This pattern of age-dependent seroprevalence is indicative of horizontal transmission among children, similar to transmission of Epstein–Barr virus (EBV), the human herpesvirus most closely related to HHV-8 [Moore et al., 1996]. Both viruses are shed in oral secretions [Yao et al., 1985; Koelle et al., 1997; Cannon et al., 2003]; thus, contact with oral secretions provides the principal route for horizontal EBV transmission and is the route most likely involved in HHV-8 transmission among children.

Modes of transmission and age of primary infection for HHV-8 in areas where KS is not endemic remain unclear, and few studies have included sera from children. Therefore, the present study examined the seroprevalence of HHV-8 by age in a large population of children from the US and Germany. For comparison, sera from young children from Nigeria, a KS-endemic area, were included. All specimens were also tested for antibodies to EBV to provide data on any possible relationship between infection with these two related viruses.

MATERIALS AND METHODS

Study Populations and Clinical Specimens

Three panels of serum specimens were tested: 552 sera from children 6 months to 18 years old seen at Atlanta and North Georgia area hospitals in the US for illness or routine care; 235 sera from children 6 months to 17 years old residing in Northern Germany being seen for illness or routine care; and 184 sera obtained from young children 6–38 months of age residing in Jos, Plateau State, Nigeria, during a randomized community survey in which no more than two children per household were sampled [Pfitzner et al., 1998]. Specimens from Nigerian children older than 38 months were not available. All specimens were stored at -20°C prior to testing.

HHV-8 Serology

All sera were screened in duplicate wells with two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using peptides derived from the ORF65 viral capsid protein [Pau et al., 1998] and the ORFK8.1 viral envelope protein [Spira et al., 2000]. Antigen preparation, plate coating, and ELISA methods were as described [Pau et al., 1993]. Cut-offs for the ORF65 and the ORFK8.1 assays were the mean corrected optical density at 450 nm of 18 negative control specimens plus 5 or 8 standard deviations (SD), respectively. The assay cut-offs were established by optimal separation of 100 negative controls from the Centers for Disease Control

employee serum bank and 30 positive control sera from KS patients. The specimens were also tested by a whole cell immunofluorescence assay (IFA), in which HHV-8 is induced to lytic replication. The slides and assay were prepared according to the procedure of Lennette et al. [1996], except serum specimens were diluted further to 1:40. Each slide was read by two experienced personnel. Positive specimens were tested twice with different lots of slides. Specimens positive by IFA or by both of the ELISA tests were reported as positive. IFA antibody titers were determined by twofold serial dilutions, beginning at 1:40.

EBV Serology

Sera were tested for the presence of EBV-specific viral capsid antigen (VCA) IgG by using the ETI-VCA-G ELISA kit (DiaSorin, Inc., Stillwater, MN) according to the manufacturer's instructions or the VCA IgG IFA (Bion Enterprises Ltd., Des Plaines, IL). Selected specimens were tested for the presence of VCA IgM with the ETI-M reverse and the ETI-EBNA-G kits (DiaSorin, Inc.), according to manufacturer's instructions. The results obtained in the EBV ELISA tests were interpreted semi-quantitatively. Four calibrators were included as standards in each experiment and antibody titers were extrapolated from optical density results by linear regression. Antibody titers in the Nigerian specimens were determined by using the Bion VCA IFA with twofold dilutions, beginning at 1:40.

Statistical Analysis

Seroprevalence rates were compared between populations by use of the χ^2 -test or Fisher's exact test. The increase in seroprevalence with age was assessed using the Cochran-Armitage test for trend, and a test for heterogeneity was also used to assess whether prevalences among age groups were different. Linear regression analysis was used to examine the relationship between EBV and HHV-8 titers. The computer programs Epi Info version 6.0 (CDC, Atlanta, GA), and SAS version 8.01 (Cary, NC) were used.

RESULTS

HHV-8 Seroprevalence

Young children 6–38 months of age in the US, Germany, and Nigeria. HHV-8 seroprevalence was higher among young children in Nigeria (14%) than among those in the US (6%) and Germany (4%) (Table I), and Nigerian children showed increasing seroprevalence with age ($P=0.067$) (Fig. 1). There were too few positive sera among US and German children to evaluate trends in this age group.

Children 6 months to 17 years in the US and Germany. HHV-8 seroprevalence rates for the US and Germany were low in all age groups (Fig. 2). Among US children, the median age was 9 years and seroprevalence ranged from 0% to 6% (mean 4%) without significant age or gender (5% male vs. 3% female) associations. HHV-8 antibody titers, however, decreased

TABLE I. Seroprevalence Rates for HHV-8 and EBV Among Infants and Children in the United States (US), Germany, and Nigeria

Age group, country	n	HHV-8	EBV
		seropositive (%)	seropositive (%)
6–38 months			
US ^a	88	5 (6)	40 (45)
Germany	75	3 (4)	26 (35)
Nigeria	184	25 (14)	161 (88)
38 months to 17 years			
US ^b	464	15 (3)	312 (67)
Germany	160	5 (3)	118 (74)
6 months to 17 years			
US	552	20 (4)	352 (64)
Germany	235	8 (3)	144 (61)

^aSpecimens include those from children aged 6–35 months only.

^bSpecimens include those from children 36 months to 17 years old.

with age. Positive sera from children ages 6 months to 5 years old had higher geometric mean antibody titers (GMT) than did positive sera from children 6–11-years old (GMT 1:177 vs. 1:66, $P < 0.01$) and 12–17-years old (GMT 1:57, $P < 0.01$).

Among German children, the median age was 6 years and seroprevalence ranged from 0 to 8% with a mean of 3%. No trend with age was apparent, but the small number of positive sera precluded the ability to detect anything less than a very strong trend.

EBV Seroprevalence

Young children 6–38 months of age in the US, Germany, and Nigeria. Young Nigerian children had a higher EBV seroprevalence (88%) than did similarly aged children from the US (45%) or Germany (35%) ($p < 0.05$) (Table I). Moreover, very high EBV antibody titers ($\geq 10,240$) were common among the Nigerian children (39%) compared with titers among US (3%) and German children (0%).

Children 6 months to 17 years of age in the US and Germany. Among US children, 64% were positive for VCA IgG (Table I), with no significant difference between boys and girls (60% vs. 67%, $P = 0.08$). Seroprevalence increased significantly with age ($P < 0.05$). GMTs, as calculated from the semi-quantitative ELISA

data, showed a statistically significant trend with age ($P < 0.05$), with small increases from one age group to the next. Among children from Germany, 61% were seropositive for EBV, and there was a significant increase in seropositivity with age ($P < 0.05$), but there was not a significant age-related increase in the GMTs for VCA IgG.

On the basis of several lines of evidence, the high seroprevalence of EBV (71%, 17/24) among US children 6–11 months of age could have been due largely to residual maternal antibody. First, only 6% (1/17) were VCA IgM positive (indicating current infection), with interpretation being limited by the brief duration of IgM detection (4 weeks) in young children [Jenson, 2002]. Second, 76% (13/17) of the VCA IgG-positive sera in the 6–11-month-old children were low positive according to standards supplied with the kit, which is consistent with the presence of waning maternal antibody and less consistent with the high antibody titers that typically follow primary EBV infection. Third, 41% (7/17) of the VCA IgG-positive sera were positive for EBV nuclear antigen, indicating that past infection in the form of maternal antibody is the likely explanation for the high rate of seroprevalence among children under 1 year of age.

Relationship Between HHV-8 and EBV Seropositivity

The genetic relatedness of HHV-8 and EBV has raised the issue of possible serologic cross-reactivity between antibodies to these two viruses. EBV titers in Nigeria were exceptionally high, which could enhance cross-reactivity if present; we therefore examined HHV-8 seropositivity as a function of EBV titer in that population with the following results: study participants who were EBV seronegative were 13% HHV-8 seropositive; participants with EBV titers of 40–1280, 2560–5120, and equal to or greater than 10240 were 20%, 14%, and 13% HHV-8 seropositive, respectively. Therefore, seroprevalence of HHV-8 did not increase with EBV antibody titer. In addition, HHV-8 titers did not correlate with EBV titers (Fig. 3), further suggesting a lack of serologic cross-reactivity.

DISCUSSION

This study examined the seroprevalence of HHV-8 in 787 children from the US and Germany and constitutes the largest HHV-8 serologic survey to date among children from areas where KS is not endemic. For comparison, sera from young children in a KS-endemic area, Plateau State, Nigeria, were included. In addition, we tested all sera for antibodies to EBV (the human herpesvirus most closely related to HHV-8) to examine any possible relationship between infection with these two viruses. EBV testing was also used as a reference to establish that the serum panels showed the expected age-dependent seroprevalence pattern, further validating our HHV-8 results.

We found low HHV-8 seroprevalence rates for children ages 6 months to 17 years from the US (4%) and

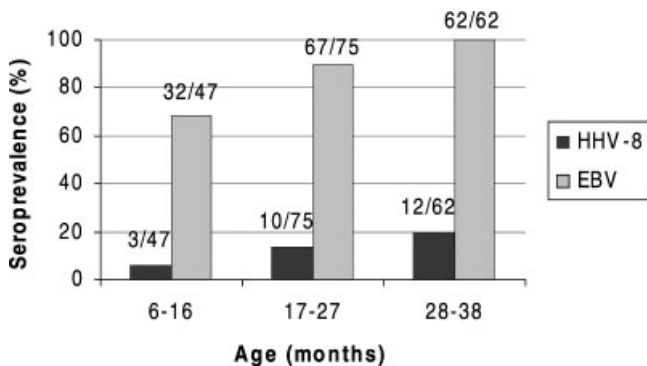


Fig. 1. HHV-8 and EBV seroprevalence by age in Nigeria. The number positive/number tested are shown above each bar. $P = 0.067$ for HHV-8, $P < 0.01$ for EBV.

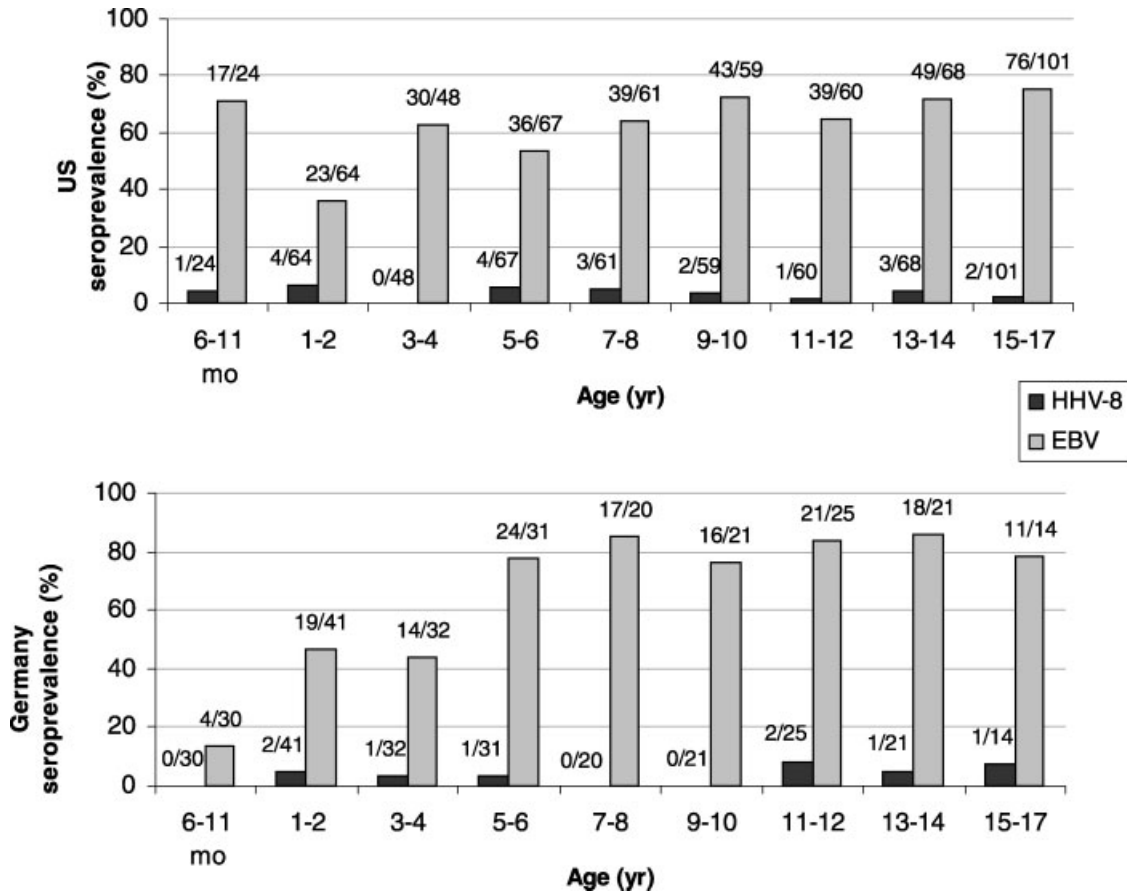


Fig. 2. HHV-8 and EBV seroprevalence by age in the United States (US) and Germany. Ages are shown in months (mo) or years (yr), and the number positive/number tested are shown above each bar.

Germany (3%), with no discernable trends for sex or age. However, in US children, there was a significant trend of decreasing antibody titers with age. This could indicate, on average, more recent infections in the younger children. As determined on the basis of limited longitudinal studies, HHV-8 antibody is at peak levels within a year following the first appearance of viral DNA

in the blood, and then drops to low levels in most individuals within 2–3 years [Wang et al., 2001; Dollard et al., unpublished communication].

Diagnostic assays for the gammaherpesvirus HHV-8 are not yet standardized, and reported rates of seroprevalence vary depending on the assays and algorithms applied. Previous studies reported HHV-8 seropreva-

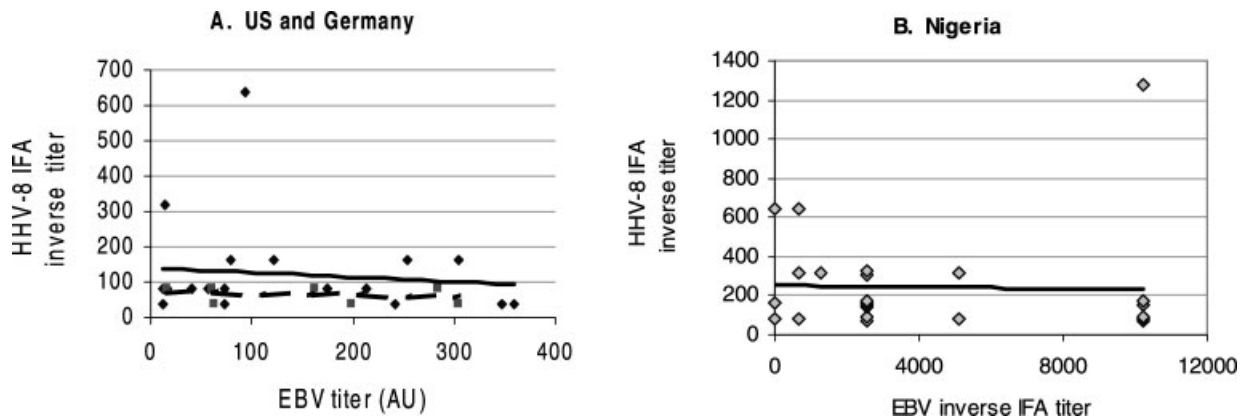


Fig. 3. Relationship between HHV-8 and EBV antibody titers showing only HHV-8-positive specimens. A: ♦ US ($P = 0.631$), ■ Germany ($P = 0.556$). AU: Arbitrary units from semi-quantitative VCA IgG ELISA. B: Nigeria ($P = 0.875$). EBV titers by VCA IgG IFA.

lence rates of 5–20% for US and German blood donors [Lennette et al., 1996; Simpson et al., 1996; Chatlynne et al., 1998; Ablashi et al., 1999] and 0–4% for healthy children from the US [Lennette et al., 1996; Blauvelt et al., 1997; Chandran et al., 1998a,b]. The results are consistent with these low seroprevalences reported for children: using similar assays and algorithms, our laboratory found a seroprevalence rate of 3% among 1000 US blood donors [Pellett et al., unpublished data]. This study tested a much larger number of pediatric specimens than did other studies, although our use of specimens from hospitals in non-KS-endemic areas could have over-represented infected children, resulting in higher estimates of HHV-8 seroprevalence than would occur in the general population. It is also important to note that in this study and in others, the number of infected individuals may be overestimated in low-risk populations resulting from decreased positive predictive value of serologic assays in general in low-risk populations [Engels et al., 2000]. Having said that, evidence for most of the seropositive sera we identified being true positives includes end-point titration of antibodies by IFA, clear, bright cytoplasmic staining in two different slide batches, and positive interpretation by two independent readers.

HHV-8 seroprevalence was significantly higher among children aged 6–38 months from Nigeria than among the US and German children. This finding was expected since Nigeria is endemic for HHV-8, and KS accounts for 15–20% of malignant tumors in regions of the country [Ziegler, 1993]. These children were also more often positive by multiple serology assays, as seen in other high-risk populations [Rabkin et al., 1998; Spira et al., 2000], and showed a trend for increasing seroprevalence with age, consistent with previous studies [Kasolo et al., 1997; Bourboulia et al., 1998; Mayama et al., 1998; Andreoni et al., 1999; Gessain et al., 1999].

EBV seroprevalence was substantially higher than HHV-8 seroprevalence among all age groups in all populations, even in Nigeria, and showed significant increases with age in the US and Germany, as expected. There was no overt immunologic cross-reactivity between the two human gammaherpesviruses with the assays used in this study, which is in agreement with results from other studies [Lennette et al., 1996; Corchero et al., 2001].

In conclusion, HHV-8 infection occurs at low levels among children in areas where the virus is not endemic. Several studies among children from sub-Saharan Africa have shown evidence of horizontal transmission via saliva and close interpersonal contact [Kasolo et al., 1997; Bourboulia et al., 1998; Mayama et al., 1998; Andreoni et al., 1999; Gessain et al., 1999; Andreoni et al., 2002]. Our results suggest that horizontal transmission routes may also play a role in areas of lower seroprevalence. The lack of increase in seroprevalence rates with age suggests that HHV-8 antibodies may not always persist long term. However, because the number of positive sera was small and longitudinal specimens

were not examined in this study, this could not be determined with certainty. There was no cross-reactivity among assays for HHV-8 and EBV despite the genetic and biologic similarities between these two viruses. EBV appears to be much more readily transmitted than HHV-8: approximately 90% of the adult population worldwide have evidence of past infection [Cohen, 2000]. This study contributes to a better understanding of HHV-8 epidemiology in areas where the virus is not endemic. Fundamental questions remain regarding HHV-8 infection, including cofactors for and routes of transmission and other possible clinical associations.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Joanne L. Patton for performing EBV serology on the specimens from Nigeria; Dr. Mark Pfitzner, Dr. Philip Fischer, and Dr. Christian Isichei for their contributions in conducting the random cluster survey; Dr. Alash'le Abimiku for providing the specimens from Jos, Nigeria; and Professor Dr. med. S.K.W. Wiersbitzky and Professor Dr. Tino F. Schwarz for providing the German specimens. This study was supported in part by a fellowship from SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica).

A CDC/NCHSTP Human Subjects Review Waiver was obtained for the specimens from Jos, Nigeria based on removal of patient identifiers prior to analysis. The specimens from the US and Germany were exempt from Human Subjects Review because information on age only or age and gender only was recorded before specimens were transferred to clean tubes; no linkages between these specimens and patient identifiers exist at the CDC or elsewhere.

REFERENCES

- Ablashi DV, Chatlynne L, Cooper H, Thomas D, Yadav M, Norhanon AW, Chandram K, Churdisonchart V, Kulpradist AA, Patnaik M, Liegmann K, Mossod R, Reitz M, Cleghorn F, Mann A, Levine PH, Rabkin C, Biggar R, Jensen F, Gill P, Jack N, Edward J, Whitman J, Cshoff C. 1999. Seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to USA, the Caribbean and Africa. *Br J Cancer* 81:893–897.
- Andreoni M, El Sawaf G, Rezza G, Ensoli B, Nicastrì E, Ventura L, Ercoli L, Sarmati L, Rocchi G. 1999. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: Evidence of nonsexual transmission. *J Natl Cancer Inst* 91:465–469.
- Andreoni M, Sarmati L, Nicastrì E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, Bugarini R, Parisi SG, Rezza G. 2002. Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. *JAMA* 287:1295–1300.
- Antman K, Chang Y. 2000. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* 342:1027–1038.
- Blauvelt A, Sei S, Cook PM, Schulz TF, Jeang KT. 1997. Human herpesvirus 8 infection occurs following adolescence in the United States. *J Infect Dis* 176:771–774.
- Bourboulia D, Whitby D, Boshoff C, Newton R, Beral V, Carrara H, Lane A, Sitas F. 1998. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *JAMA* 280:31–32.
- Cannon MJ, Dollard SC, Black JB, Edlin BR, Hannah C, Hogan SE, Patel M, Jaffe HW, Offermann MK, Spira TJ, Pellett PE, Gunthel CJ. 2003. Risk factors for Kaposi's sarcoma in men seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *AIDS* 17:215–222.

- Chandran B, Bloomer C, Chan SR, Zhu L, Goldstein E, Horvat R. 1998a. Human herpesvirus-8 ORF K8.1 gene encodes immunogenic glycoproteins generated by spliced transcripts. *Virology* 249:140–149.
- Chandran B, Smith MS, Koelle DM, Corey L, Horvat R, Goldstein E. 1998b. Reactivities of human sera with human herpesvirus-8-infected BCBL-1 cells and identification of HHV-8-specific proteins and glycoproteins and the encoding cDNAs. *Virology* 243:208–217.
- Chatlynne LG, Lapps W, Handy M, Huang YQ, Masood R, Hamilton AS, Said JW, Koeffler HP, Kaplan MH, Friedman-Kien A, Gill PS, Whitman JE, Ablashi DV. 1998. Detection and titration of human herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, acquired immunodeficiency syndrome patients, and Kaposi's sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 92:53–58.
- Chokunonga E, Levy LM, Bassett MT, Borok MZ, Mauchaza BG, Chirenje MZ, Parkin DM. 1999. Aids and cancer in Africa: The evolving epidemic in Zimbabwe. *AIDS* 13:2583–2588.
- Cohen JI. 2000. Epstein–Barr virus infection. *N Engl J Med* 343:481–492.
- Corchero JL, Mar EC, Spira TJ, Pellett PE, Inoue N. 2001. Comparison of serologic assays for detection of antibodies against human herpesvirus 8. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:913–921.
- Eltom MA, Jemal A, Mbulaiteye SM, Devesa SS, Biggar RJ. 2002. Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. *J Natl Cancer Inst* 94:1204–1210.
- Engels EA, Whitby D, Goebel PB, Stossel A, Waters D, Pintus A, Contu L, Biggar RJ, Goedert JJ. 2000. Identifying human herpesvirus 8 infection: Performance characteristics of serologic assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23:346–354.
- Gessain A, Maucelere P, van Beveren M, Plancoulaine S, Ayoub A, Essame-Oyono JL, Martin PM, de The G. 1999. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int J Cancer* 81:189–192.
- Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. 2000. Classic kaposi sarcoma: Epidemiology and risk factors. *Cancer* 88:500–517.
- Jenson HB. 2002. Infectious mononucleosis. In: Jenson HB, Baltimore RS, editors. *Pediatric infectious diseases: Principles and practice*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co. 426 p.
- Kasolo FC, Mpabalwani E, Gompels UA. 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.
- Koelle DM, Huang ML, Chandran B, Vieira J, Piepkorn M, Corey L. 1997. Frequent detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of human immunodeficiency virus-infected men: Clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 176:94–102.
- Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348:858–861.
- Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. 1998. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer* 77:817–820.
- Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, Garber R, Pellett PE, McGeoch DJ, Chang Y. 1996. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 70:549–558.
- Parkin DM, Wabinga H, Namboze S, Wabwire-Mangen F. 1999. AIDS-related cancers in Africa: Maturation of the epidemic in Uganda. *AIDS* 13:2563–2570.
- Pau CP, Lee-Thomas S, Auwanit W, George JR, Ou CY, Parekh BS, Granade TC, Holloman DL, Phillips S, Schochetman G. 1993. Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* 7:337–340.
- Pau CP, Lam LL, Spira TJ, Black JB, Stewart JA, Pellett PE, Respass RA. 1998. Mapping and serodiagnostic application of a dominant epitope within the human herpesvirus 8 ORF 65-encoded protein. *J Clin Microbiol* 36:1574–1577.
- Pfitzer MA, Thacher TD, Pettifor JM, Zoakah AI, Lawson JO, Isichei CO, Fischer PR. 1998. Absence of vitamin D deficiency in young Nigerian children. *J Pediatr* 133:740–744.
- Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI, Chatlynne L, Biggar RJ. 1998. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. HHV-8 Interlaboratory Collaborative Group. *J Infect Dis* 178:304–309.
- Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L, Howard MR, Gao SJ, Bohenzky RA, Simmonds P, Lee C, de Ruiter A, Hatzakis A, Tedder RS, Weller IVD, Weiss RA, Moore PS. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 348:1133–1138.
- Spira TJ, Lam L, Dollard SC, Meng YX, Pau CP, Black JB, Burns D, Cooper B, Hamid M, Huong J, Kite-Powell K, Pellett PE. 2000. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J Clin Microbiol* 38:2174–2180.
- Wang QJ, Jenkins FJ, Jacobson LP, Kingsley LA, Day RD, Zhang ZW, Meng YX, Pellet PE, Kousoulas KG, Baghian A, Rinaldo CR, Jr. 2001. Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8(+) T-cell response to viral lytic cycle proteins. *Blood* 97:2366–2373.
- Whitby D, Luppi M, Sabin C, Barozzi P, Di Biase AR, Balli F, Cucci F, Weiss RA, Boshoff C, Torelli G. 2000. Detection of antibodies to human herpesvirus 8 in Italian children: Evidence for horizontal transmission. *Br J Cancer* 82:702–704.
- Yao QY, Rickinson AB, Gaston JS, Epstein MA. 1985. In vitro analysis of the Epstein–Barr virus: Host balance in long-term renal allograft recipients. *Int J Cancer* 35:43–49.
- Ziegler JL. 1993. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet* 342:1348–1351.

Evidence for both Lytic Replication and Tightly Regulated Human Herpesvirus 8 Latency in Circulating Mononuclear Cells, with Virus Loads Frequently below Common Thresholds of Detection

Elisa Martró,^{1,2} Michael J. Cannon,¹ Sheila C. Dollard,¹ Thomas J. Spira,³ A. Scott Laney,^{1†} Chin-Yih Ou,³ and Philip E. Pellett^{1,4*}

Division of Viral and Rickettsial Diseases¹ and Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research,³ Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia; Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain²; and Department of Molecular Biology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio⁴

Received 3 March 2004/Accepted 15 June 2004

To address whether human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) might be the product of latent or lytic infection and to shed light on sporadic detection of HHV-8 DNA in individuals seropositive for the virus, we studied the frequency of infected cells, total virus load, and virus load per infected cell in PBMCs from men coinfecting with HHV-8 and human immunodeficiency virus (HIV), some of whom had Kaposi's sarcoma. The low frequencies of infected cells detected (fewer than one per million cells in some individuals) suggest that the prevalence of the virus in circulating leukocytes was underestimated in previous studies that employed more conventional sampling methods (single, small-volume specimens). Mean virus loads ranged from 3 to 330 copies per infected PBMC; these numbers can represent much higher loads in individual lytically infected cells ($>10^3$ genomes/cell) in mixtures that consist predominantly of latently (relatively few genomes) infected cells. The presence in some subjects of high HHV-8 mean genome copy numbers per infected cell, together with viral DNA being found in plasma only from subjects with positive PBMCs, supports earlier suggestions that the virus can actively replicate in PBMCs. In some individuals, mean virus loads were less than 10 genomes per infected cell, suggesting a tightly controlled purely latent state. HHV-8 genome copy numbers are substantially higher in latently infected cells derived from primary effusion lymphomas; thus, it appears that HHV-8 is able to adopt more than one latency program, perhaps analogous to the several types of Epstein-Barr virus latency.

Kaposi's sarcoma (KS) is an endothelial neoplasm characterized by intense angiogenesis, proliferation of spindle-like cells, and inflammation (20). Of the four epidemiologic forms, epidemic KS (also known as AIDS-KS) is frequently aggressive and is the neoplasm most frequently associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection in the United States (15).

Human herpesvirus 8 (HHV-8, or KS-associated herpesvirus) was discovered in KS lesions (11) and is necessary for the development of the disease (30). Essentially all KS lesions are positive for HHV-8 DNA. Although important aspects of its biology take place in nonlymphoid cells (e.g., KS lesion spindle cells), like the other gammaherpesviruses (e.g., Epstein-Barr virus [EBV]), HHV-8 is lymphotropic. B cells are an important target for viral infection (1, 12, 17), and latency is established in lymphoid cells. Detection of viral DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) correlates with the appearance of KS and is a useful indicator of KS risk (1, 10, 13, 36). Nonetheless, HHV-8 DNA is commonly detected in only about

50% of PBMC specimens from subjects with AIDS-KS (who are thus obviously infected with the virus). In comparison, EBV viral load in PBMCs is much more tightly linked to the development and progression of EBV-related malignancies, including nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease, post-transplantation lymphoproliferative disease (PTLD), and AIDS-related lymphoma. At the time of PTLD diagnosis, virus loads in PBMCs are 1,000- to 10,000-fold higher than those in healthy seropositive individuals (28). These and other differences noted by others (14) make it clear that although they have some similarities, the biologies of latency and persistence for EBV and HHV-8 are distinct.

Much of what we know of HHV-8 latency has been learned from study of transformed cell lines derived from HHV-8-associated primary effusion lymphomas (PELs). While this has been both convenient and informative, PEL is a very rare outcome of HHV-8 infection, and there are certain to be important differences between the biology of the virus in these cells and in vivo in HHV-8-infected individuals without PEL.

Thus there are several outstanding questions about the mechanisms by which HHV-8 persists in PBMCs and the relationship of persistence to KS pathogenesis. Does the virus in PBMCs represent lytic or latent infection? What is the balance between lytically and latently infected PBMCs? Are PBMCs (be they lytically or latently infected) the source of virus for

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Biology, NN10, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Ave., Cleveland, OH 44195. Phone: (216) 445-8411. Fax: (216) 444-2998. E-mail: pellett@ccf.org.

† Present address: Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15213.

initiating KS lesions, or do they become infected by circulating in proximity of a nexus of infection (such as a KS lesion) (2)? In individuals who have KS or are HHV-8 seropositive, but whose PBMCs are negative for viral DNA by PCR, is the virus load simply beneath the level of detection or is the virus truly absent?

We have been studying the behavior of the virus in the natural host, focusing on men infected with both HIV and HHV-8, some with KS (10, 16a). Thus far, studies by others have focused on the number of HHV-8 genomes per volume of blood or per quantity of PBMCs (4, 6, 8, 23, 33). The frequency of infected blood cells or the number of HHV-8 genomes per infected cell, fundamental metrics in answering some of the outstanding questions outlined above, has not been measured. Here we describe the results obtained with a PCR-based limiting dilution assay developed for this purpose.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and specimens. Thirteen HIV-1-infected men who have sex with men were included in the study. All were HHV-8 seropositive; nine had a KS history (five with active and four with prior disease). Because they are infected with both HIV-1 and HHV-8, those who never had KS are referred to as having high risk for KS. Patients were chosen from individuals participating in ongoing studies of HIV-related disease and HHV-8 (10, 31). Informed consent was obtained from subjects, and human experimentation guidelines of the U.S. Department of Health and Human Services and those of the authors' institutions were followed in the conduct of this research. PBMCs were obtained by Ficoll density gradient centrifugation of heparinized or EDTA-treated peripheral blood. For subject 12, PBMCs were obtained by leukapheresis. Residual erythrocytes in isolated PBMCs were lysed with 155 mM ammonium chloride. PBMCs were preserved in cryopreservation medium and stored in liquid nitrogen. Serum and plasma were stored at -20°C .

HHV-8 serology. All sera were screened in duplicate wells with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a peptide derived from the HHV-8 open reading frame (ORF) K8.1 virion envelope protein (31). Endpoint titers were determined using twofold dilutions. Antigen preparation, plate coating, and ELISA methods were as described previously (22). The assay cutoff was the mean corrected optical density at 450 nm (OD_{450}) of five pools of negative control sera plus 0.150 OD units. Lytic antigen immunofluorescence was done on BCBL-1 cells as previously described (24).

HIV virus load measurement. HIV virus loads were measured with a duplex fluorescent 5' nuclease reverse transcription-PCR (RT-PCR; Taqman) (Ou et al., unpublished data). HIV-1 RNA was isolated from 200 μl of plasma with a QIAGEN virus kit (QIAGEN, Valencia, Calif.). An RNA-containing phage was added to the plasma to serve as an internal calibrator for RNA isolation and the subsequent RT-PCR detection. Plasma RNA was eluted in 50 μl of water, and 25 μl was used in the assay, which consisted of RT, amplification, and simultaneous detection of HIV and the internal control RNA, with a dynamic detection range extending from 457 to 1 million HIV-1 copies per ml.

CD4 counts. CD4 counts and percentages were analyzed on whole blood by fluorescence-activated cell sorting analysis on FACScan or FACSort using Tritest or MultiTEST reagents with MultiSET software (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, Calif.).

DNA extraction from plasma. DNA present in 200 μl of clarified plasma (500 \times g for 15 min) was extracted with the QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN) after addition of 6 μg of poly(dA) as a carrier (Roche Molecular Biochemicals). Extracted DNA was eluted in 60 μl of distilled deionized UV-treated type II water. Negative and positive controls consisted of 200 μl of plasma from an HHV-8 PCR-negative blood donor, both alone and spiked with 100 copies of control plasmid containing the HHV-8 *orf37* PCR target (*orf37*-pPICZ α A), respectively.

LDA. The limiting dilution assay (LDA) was performed as follows. As described by Trippler et al. (34), multiple replicates of serial threefold dilutions of both intact and lysed cells were analyzed in a separate series of experiments to measure both the number of cells containing one or more HHV-8 genome copies (infected-cell frequency) and the number of lysed cells needed to detect one copy on average (genome frequency). The quotient of these two frequencies provides the mean HHV-8 genome copy number per infected cell.

For the cell dilution method, four serial threefold dilutions of cells were made starting from a suspension of 4.2×10^6 PBMCs and 12 replicates per dilution were tested: the number of cells per well ranged from 2×10^5 to 2.5×10^3 (Fig. 1A). PBMCs were lysed in 96-well plates in a final volume of 10 μl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% lauryl ether, 100-mg/ml proteinase K), incubated for 2 h at 65°C , and then inactivated for 15 min at 95°C in a thermocycler (96-well GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems).

For the cell lysate dilution method (Fig. 1B), 4.2×10^6 cells were lysed in 210 μl of lysis buffer, incubated for 2 h at 65°C , and then inactivated for 15 min at 95°C in a heating block. Six 1:3 dilutions were then made in the same way as for the cell dilution method. To determine the first negative dilution, 1 of 13 replicates from each threefold dilution was tested by quantitative PCR in a preliminary experiment. The other 12 replicates were subsequently tested for the five serial dilutions surrounding and including this dilution (one above and three below the last positive dilution). Dilutions were done on ice.

Although a quantitative Taqman PCR system was used in the LDA experiments, the LDA calculations were based solely on the qualitative use of the Taqman results (positive or negative for each well).

Quantitative PCR. A duplex quantitative Taqman PCR system was optimized for HHV-8 *orf37* and cellular RNase P. The PCR primers and 6-carboxyfluorescein (FAM)-labeled probe used to quantify *orf37* have been described previously (32), but a Black Hole Quencher (BHQ1; Biosearch Technologies, Novato, Calif.) was used instead of 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA). The forward and reverse primers used for RNase P amplification (kindly provided by Karen McCaustland and Brian Holloway) were 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3' and 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3', respectively; the probe was 5'-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3', labeled at the 5' end with 6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein (JOE) and at the 3' end with BHQ. Primers and probes were synthesized by standard phosphoramidite chemistry techniques at the Centers for Disease Control and Prevention Biotechnology Core Facility. Amplification was performed in 50- μl reaction mixtures consisting of 2 \times universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) containing Amp Erase uracil *N*-glycosylase (UNG), primers and probes for both HHV-8 and RNase P, and 10 μl of template DNA. To achieve an efficient duplex reaction, primer/probe concentrations for both targets were reoptimized starting from previously optimized concentrations for single-plex amplification (32). The optimized concentrations for the HHV-8 *orf37* primers were 900 nM, 250 nM for the probe, and 100 nM for the RNase P primers and probe. Following activation of the UNG (2 min at 50°C) and then the polymerase (10 min at 95°C), 45 cycles (15 s at 95°C and 1 min at 60°C) were performed with an ABI Prism 7700 Sequence detector system (Applied Biosystems). Ten-fold dilutions of the *orf37*-pPICZ α A plasmid were used to generate an HHV-8 standard curve (10,000 to 10 copies, in duplicate) or controls for single-copy and 10-copy sensitivity (1 or 10 copies in each of six replicates), by adding the plasmid dilutions to lysis buffer alone or to 2×10^5 uninfected PBMCs prior to cell lysis. The standard curve dilutions, the controls for one-copy sensitivity, and negative controls (lysed uninfected PBMCs alone and water alone) were included in each 96-well PCR plate. For the RNase P standard curve, purified human DNA was used (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Ind.) in a background of lysis buffer. For the clinical specimens, the quantity of human DNA in micrograms determined by quantitative PCR based on the standard curve was converted to cell number, assuming 6.6 pg of human DNA per diploid cell. The absence of inhibitors in the processed clinical specimens was assessed by verifying that the RNase P copy number decreased linearly along the dilution series.

To further exclude the presence of PCR inhibition by the crude cell lysates, the highest cell concentration (2×10^5 PBMCs per 10 μl) was tested for each subject using the TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents kit, which contains a preoptimized internal positive control (IPC). IPC (0.2 fg) was spiked into samples to distinguish true target negatives from PCR inhibition (32). The IPC DNA was detected with limiting concentrations of primers and a VIC-labeled probe. HHV-8 virus load in plasma specimens was assessed with this HHV-8/IPC duplex reaction. Data acquisition and analysis were done with sequence detector software (version 1.7; Applied Biosystems).

Statistical analysis. For the cell dilution and cell lysate dilution methods, frequencies of infected cells and frequency of HHV-8 genomes were calculated from the percentage of negative wells at each tested dilution according to Poisson statistics. These calculations were done with the QUALITY program (Mullins Molecular Retrovirology Laboratory; <http://ubik.microbiol.washington.edu/cbg/jquality.htm>), which is based on a minimum chi-square method (27). Chi-square and *P* values were used to test goodness of fit.

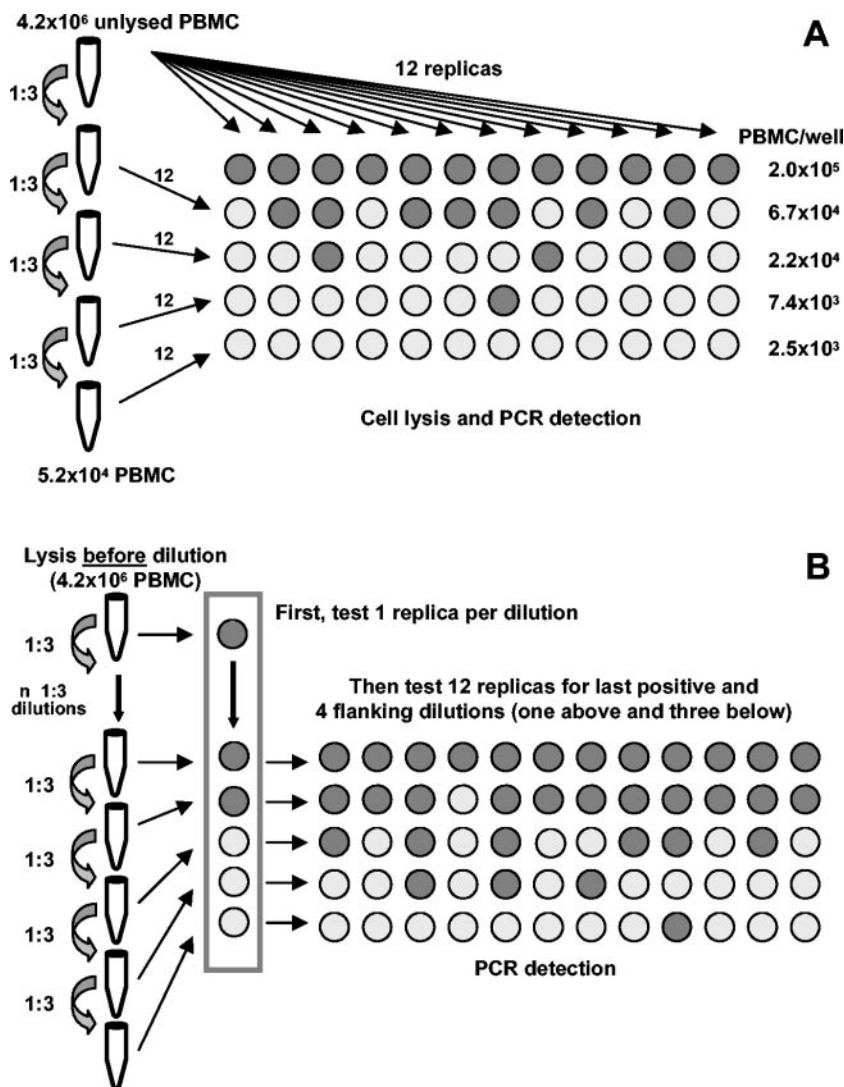


FIG. 1. LDA. (A) Cell dilution LDA for the assessment of infected-cell frequencies. (B) Cell lysate dilution LDA for the assessment of genome frequencies.

RESULTS

PCR optimization and validation. Several aspects of the PCR assays were optimized and validated. In all quantitative PCR assays, the standard curve (threshold cycle (Ct) versus the logarithm of the plasmid copy number) was linear ($r^2 \geq 0.99$). The slopes of the standard curves indicated that after optimization, PCR amplification efficiency was over 85% for RNase P and over 90% for HHV-8. The presence of a crude lysate corresponding to 2×10^5 PBMCs from an HHV-8 PCR-negative blood donor had negligible effects on amplification efficiency (data not shown). Moreover, low concentrations of IPC were positive for all specimens tested, further ruling out PCR inhibition. The sensitivity of the technique was tested by using dilutions of a control plasmid containing the HHV-8 *orf37* target; it was possible to amplify approximately one copy of HHV-8 DNA, in a background of lysis buffer or a cell lysate corresponding to 2×10^5 PBMCs from an HHV-8 PCR-negative blood donor, from about 50% of the replicates (range, 17

to 83%); this is in agreement with the percentage of positive reactions predicted from the Poisson distribution (63%). Cell copy numbers determined by quantitative PCR for the RNase P gene were verified by counting cells with a hemacytometer (within a twofold range); copy numbers obtained from dilution series decreased in an appropriately linear manner. Negative controls (including no-template controls and PBMCs from HHV-8-negative blood donors) were never positive. Consistently negative wells in subject PBMC dilutions below the endpoints acted as further negative controls.

LDA validation. The LDA was validated using the HHV-8-infected BCBL-1 cell line, either uninduced or tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) induced. In the example shown in Table 1, BCBL-1 cells were washed twice and then diluted with PBMCs from an HHV-8 PCR-negative blood donor to create a controlled representation of the frequency of HHV-8-infected cells observed in KS subjects in preliminary experiments (approximately 10 or 20 BCBL-1 cells per million PBMCs);

TABLE 1. Mean HHV-8 genome copy number per cell in uninduced and TPA-induced BCBL-1 cells

Run or mean ^a	No. of infected cells/10 ⁶ cells		No. of genomes/10 ⁶ cells		Mean no. of genomes/infected cell (<i>G</i>)		No. of genomes/cell ^b :	
	Uninduced	TPA induced	Uninduced	TPA induced	Uninduced	TPA induced	Latently infected (<i>G</i> _{lyt})	Lytically infected (<i>G</i> _{lat})
1	19	7	2,126	1,628	113	231	100	1,411
2	15	12	1,356	4,674	88	383	55	3,333
Mean					100	307	78	2,372

^a Run 1 included a cell mixture at a concentration of 20 BCBL-1 cells per million PBMCs. Run 2 included a cell mixture at a concentration of 10 BCBL-1 cells per million PBMC.

^b Calculated for each run from the mean genomes per infected cell (*G*), and the observed percentages of latently and lytically infected cells in TPA-induced and uninduced BCBL-1 cultures, using the following expressions: $G_{\text{induced}} = 0.9 \times G_{\text{lat}} + 0.1 \times G_{\text{lyt}}$ and $G_{\text{uninduced}} = 0.99 \times G_{\text{lat}} + 0.01 \times G_{\text{lyt}}$.

this mixture was then processed through the LDA procedures as described above. The estimated frequencies of infected cells were close to the intended input numbers; the mean viral genome loads per infected cell were 100 copies for uninduced cells and 307 copies for induced cells. *P* values determined by the QUALITY program were always greater than 0.05, indicating a reasonable fit of the model to the data. With 1% of uninduced cells being in the lytic state and 10% being lytic after TPA induction (as measured experimentally by indirect immunofluorescence with a rabbit antibody to HHV-8 gB, a lytic antigen), these loads correspond to approximately 80 genomes per latently infected cell and approximately 2,400 per lytically infected cell (Table 1). The value for latently infected cells is similar to previous determinations on uninduced BCBL-1 cells by quantitative PCR (70 copies) (16, 32) and is somewhat higher than observed by fluorescent in situ hybridization or Southern blot reconstruction (25 to 30 copies) (21, 32). Taking into account differences in passage lineages, that the percentage of cells induced to the lytic state at the time of harvest may differ from experiment to experiment, and the extreme dilution of infected cells into uninfected cells in our

representations of in vivo infected cell frequencies (10 and 20 infected cells per million uninfected cells), the results demonstrate that the LDA methods used here are likely to give reasonable results when applied to in vivo materials.

A second line of validation was obtained by comparing the results of the LDA method with virus loads determined simultaneously by the quantitative Taqman assay. Over load ranges suitable for reliable Taqman quantitation (>10 genomic copies per reaction), results from the two methods correlated well ($r^2 = 0.9458$; data not shown).

Subject characteristics. Of the 13 subjects, 5 had active KS lesions, 4 previously had KS lesions, and 4 never had KS but were considered at high risk because they were infected with both HIV and HHV-8. Characteristics of these subjects are summarized in Tables 2 and 3. Subjects 7 and 8 were seen at two visits 3 and 2 months apart, respectively. All subjects were on highly active antiretroviral therapy (HAART) except for subject 8. Most subjects with KS lesions were on doxorubicin therapy, but none of them was being treated with agents that have significant in vitro activity against HHV-8. KS subjects had lower median CD4 percentages and higher median

TABLE 2. Characteristics of and LDA results for HHV-8 PCR-negative subjects

Group	KS status	CD4 count in cells/ μ l (%)	HIV load (no. of copies/ml)	HIV treatment ^a	KS treatment	Antiherpes treatment	No. of HHV-8 genomes/10 ⁶ PBMC ^b	HHV-8 antibody titer
KS subjects								
1	Cutaneous (progressing)	613 (47)	565	d4T, 3TC, NVR	Doxorubicin	No	<0.21	6,400
2	Inactive unresolved cutaneous KS	93 (7)	1,266	NFV, Combivir	No	ACV	<0.15 ^c <0.93 >0.58 ^d	3,200
3	Resolved KS, no current lesions	435 (12)	226	NFV, combivir	No	No	<1.00	400
Subjects at risk for KS								
4	No KS	558 (25)	719	NFV, NVR, Combivir	No	No	<1.20 0.34 ^c	400
5	No KS	201 (15)	1.1×10^4	ddl, d4T, NFV, NVR	No	No	<0.67	400
6	No KS	434 (18)	Undetectable	Combivir, EFV	No	No	<0.37	6,400

^a d4T, stavudine; 3TC, lamivudine; NVR, nevirapine; NFV, nelfinavir; combivir, zidovudine and lamivudine; ACV, acyclovir; ddl, didanosine; EFV, efavirenz.

^b The less than signs indicate the upper bound of virus load in individuals in whom virus DNA was not detected.

^c Result when the number of replicates was increased from 12 to 22, which led to a positive result for subject 4.

^d Result when the number of replicates was increased from 12 to 17.

TABLE 3. Clinical characteristics, frequency of HHV-8-infected PBMCs, and virus load per positive cell in HHV-8 PCR-positive subjects^a

Group ^b	KS status	CD4 count in cells/ μ l (%)	HIV load (no. of copies/ml)	HIV treatment	KS treatment	Antiherpes treatment	No. of HHV-8-infected cells/ 10^6 PBMCs	No. of HHV-8 genomes/ 10^6 PBMCs	No. of HHV-8 genomes/infected cell ^c	No. of HHV-8 genomes/200 μ l of plasma	HHV-8 antibody titer
KS subjects											
7a	Cutaneous (progressing)	207 (13)	1,041	AZT, ddl, Kaletra	Doxo	ACV	29	169	5.8	832	51,200
7b	Cutaneous (progressing) and oropharyngeal	225 (12)	<500	AZT, ddl, Kaletra	Doxo	ACV	5.4	522	97	51	51,200
8a	Cutaneous (progressing)	732 (29)	2.1×10^6	No	Doxo	No	0.84 ^c	278	331 ^d	ND	25,600
8b	Cutaneous (progressing) and oropharyngeal	342 (21)	6.4×10^5	No	No	No	4.8	826	172	46	25,600
9	Cutaneous (improving)	251 (14)	772	NFV, combivir	Doxo	No	4.5	12	2.7	ND	800
10	No current lesions (cutaneous 2 yr before)	961 (47)	170	IND, combivir	No	No	1.1	210	191	ND	1,600
11	No current lesions (transient oral 2 yr before)	7 (1)	7.3×10^6	AZT, tenofovir, amprenavir	No	No	NS	13	NS	ND	400
12	No current lesions (transient oral 7 yr before)	410 (19)	1.2×10^4	d4T, 3TC, NLF	No	No	18	1,090	61	5.3	3,200
Subjects at risk for KS											
13	No KS	296 (29)	Und.	ddl, RTV, NVR, SAQ	No	No	3.3 ^c	592	179 ^c	ND	400

^a AZT, zidovudine; ddl, didanosine; Kaletra, lopinavir/ritonavir; doxo, doxorubicin; ACV, acyclovir; NFV, nelfinavir; Combivir, zidovudine/lamivudine; IND, indinavir; RTV, ritonavir; SAQ, saquinavir; ND, not detected; Und., undetectable; NS, insufficient specimen.

^b For subjects 7 and 8, specimens were obtained at two time points, 3 and 2 months apart, respectively.

^c Mean genomes per infected cell.

^d Calculations based on 1 dilution only.

HHV-8 ORF K8.1 antibody endpoint titers (14 versus 22 and 3,200 versus 400, respectively), but too few subjects were analyzed to reliably assess whether the medians were statistically different.

Frequency of infected PBMCs and virus load in HHV-8-infected subjects. Six of the 13 subjects were PCR negative in the cell lysate dilution LDA (Table 2); thus the cell dilution LDA was not performed for them. Three of these subjects had KS, and the other three were at high risk. The frequency of the HHV-8 genome in these subjects was thus less than 0.21 to 1.2 per million PBMCs. This value is also the maximum estimated frequency of infected cells, since the number of infected cells cannot exceed the genome copy number. For subjects 1 and 4, enough cells were available to repeat the assay with 22 instead of 12 replicates; for subject 2, the assay was repeated with 17 replicates. In these assays, subjects 1 and 2 remained negative, with lowered maximum frequencies, but subject 4 tested positive with a frequency of 0.34 genomes per million PBMCs.

The cell dilution LDA was performed on samples from the seven PCR-positive subjects (six KS subjects and one subject at high KS risk) (Table 3). Infected cell frequencies ranged from 0.84 to 29 per million PBMCs (median, 4.7), and genome frequencies ranged from 12 to 1,090 (median, 278) per million PBMCs (Fig. 2). Virus loads ranged from 2.7 to 331 copies per infected PBMC (median, 134 copies). For subject 12, sufficient PBMCs were available to perform the LDA on B cells and non-B PBMCs obtained by immunomagnetic sorting with an antibody to CD19. HHV-8 DNA was almost exclusively detected in B cells, at a level (2.5 genomes per infected cell)

consistent with a low-copy-number latent infection (data not shown). The highest HHV-8 virus load per positive cell was seen in a subject (patient 8) with progressing cutaneous KS (specimen 8a), who later developed oropharynx involvement (specimen 8b). This subject was not on HAART therapy and had falling CD4 counts, which could have contributed to these results.

Rates of detection of HHV-8 DNA in PBMCs and plasma. Three of five subjects with active KS lesions, three of four subjects with prior KS, and one (two if a subject is included for whom 22 instead of 12 replicate PCRs was done) of four subjects at high KS risk were positive by PCR in PBMCs. When plasma from the same visits was tested, only two of the five subjects with KS lesions and one of the four subjects with past KS were positive by PCR (Table 3). The lower detection rate in plasma than in PBMCs is probably due at least in part to a sample volume issue: while 200 μ l of plasma was tested (representing approximately 0.4 ml of blood), the PBMCs tested in the 12 replicate reactions represented a total blood volume of 0.4 to 2.1 ml. In some studies reporting high detection rates in plasma or serum, virus particles were concentrated by centrifugation prior to DNA extraction (6, 36).

DISCUSSION

Methods used thus far for quantitative PCR of HHV-8 in PBMCs have given information only on the net number of HHV-8 genomes in the total cellular lysate sampled (expressed as either copies per microgram of total DNA or copies per

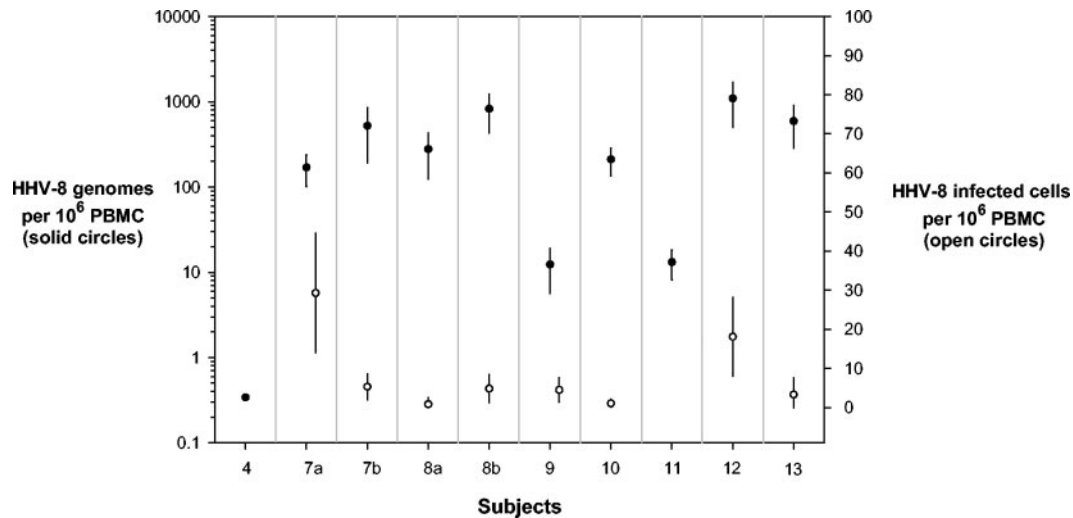


FIG. 2. Frequency of HHV-8 genome and frequency of infected cells in PCR-positive subjects with or at risk for KS. Error bars represent 95% confidence intervals (for some points, the confidence intervals are smaller than the plotted symbol). The measured frequencies were based on testing 12 replicates in each of five serial dilutions (22 replicas for subject 4), among which three to four dilutions showed percentages of negative wells between 0 and 100% and therefore were suitable for Poisson analysis. For subject 10, calculations for infected cell frequency are based only on the two informative dilutions. For the three subjects with the lowest frequency of infected cells (patients 8a and 13) and genomes (patient 4), only the lowest dilution was positive.

million cells), without regard to the percentage of the cell population actually infected (3–5, 9, 16, 23, 26, 33). Because latently infected cells can be expected to have many fewer viral genomes than lytically infected cells, some insights into the biology of HHV-8 infections of PBMCs can be gleaned from the frequency and mean viral load of infected cells. Here we developed a method for measuring the frequency of both HHV-8-infected cells and HHV-8 genomes among PBMCs, which enabled computation of the mean virus load per infected cell.

HHV-8 genome and infected-cell frequencies in PBMCs.

When measured as net HHV-8 genome copy numbers per bulk quantity of PBMCs, the frequency of HHV-8 genomes in KS subjects with a positive PCR result ranged from 12 to 1,090 copies per 10^6 PBMCs (median of 244), in agreement with other studies that used quantitative PCR (3, 4, 26). In EBV-infected individuals with PTLD, these virus genome loads would be considered low (29). Even though EBV-infected lymphoblasts proliferate in lymph nodes and circulating memory B cells are only latently infected, PTLD patients have EBV genome frequencies of 5,000 to 50,000 copies per 10^6 PBMCs at the time of diagnosis (19, 28). Furthermore, the frequency of infected cells in PCR-positive KS subjects (0.84 to 29 per million PBMCs) is low enough to overlap with the higher end of the range of frequencies of EBV latently infected cells in healthy carriers (0.1 to 24 per million PBMCs) (37), again emphasizing the biological differences between the two human gammaherpesviruses. Explanations for this relatively low frequency of infected cells in blood of persons with KS may be that although HHV-8 is a lymphotropic virus, infected lymphocytes may be localized mainly in lymphoid tissues rather than circulating in peripheral blood, or other tissues might harbor the virus. Relevant to this hypothesis, the closely related murine gammaherpesvirus 68 (murid herpesvirus 4) can establish a latent infection in the spleen, with infected-cell frequencies

among splenocytes that vary depending on the stage of infection (35).

Consistent with studies in which detection of HHV-8 DNA in PBMCs correlated with the appearance of KS (1, 13, 26, 36), among PCR-positive subjects, the range of infected-cell frequencies for KS subjects was higher than that in subjects at high KS risk (0.84 to 29 per million PBMCs versus 0.34 to 3.3 per million PBMCs), although the number of subjects included in our study was too small to claim this as a definitive result. Likewise, the frequency of detecting HHV-8 DNA in PBMCs was higher in subjects with active or prior KS lesions than in subjects at high KS risk (6 of 9 versus 1 of 4 under our standard LDA conditions). In both of the subjects in whom KS progressed to the oropharynx between consecutive visits, HHV-8 genome copy numbers in their blood increased. In one subject, this was associated with an increased number of virus genomes per positive cell, and in the other, it was associated with an increase in the frequency of infected cells in PBMCs. Interestingly, KS spindle-like cells can be detected in the PBMC fraction of peripheral blood of HIV-positive patients with or at risk for KS, a possible explanation for the multifocal nature of this disease (7). However, the third subject with progressing KS had fewer than 1 HHV-8 genome per 6 million PBMCs, consistent with prior observations that KS lesions are not always associated with high virus levels in PBMCs (4, 5, 16). In sum, while there is an association in our data and in data from others, peripheral blood virus load is much less tightly linked to pathogenesis for HHV-8 and KS than for EBV and PTLD.

Prevalence of HHV-8 in PBMCs. Rates for detecting HHV-8 DNA by PCR in PBMCs from AIDS-KS patients in America and Europe in the HAART era range from 30 to 70% (3–5, 9, 10, 18). Our results make it clear that HHV-8 DNA detection rates in PBMCs are dependent on the number of cells used for DNA extraction.

Subjects with KS or at risk for KS who had the lowest

detected frequencies of infected cells harbored one HHV-8-infected cell per 8 or 20 μg of DNA (obtained from approximately 0.8 or 2 ml of blood, respectively); according to the Poisson distribution, even larger volumes would need to be sampled to achieve reliable detection. In patients with higher numbers of genomes per infected cell, the detection of one HHV-8 genome would require less human DNA per PCR, as long as the initial number of cells processed for DNA extraction was sufficient to contain at least one infected cell. To obtain reliable detection in patients with low loads per infected cell (e.g., patient 9 with three copies per infected cell), a large number of cells would need to be processed and a large quantity of this material would need to be assayed by PCR.

Thus, the likelihood of detecting the HHV-8 genome is dependent on the number of cells lysed initially, the virus copy number per infected cell, and the total amount of DNA sampled by PCR. In some reports with low rates of HHV-8 DNA detection in PBMCs from AIDS-KS, small amounts of DNA (0.2 to 3.3 μg , representing 3×10^4 to 5×10^5 PBMCs) were used per PCR, and multiple specimens were not analyzed to increase the amount of DNA being sampled (3–5, 9, 10, 13, 18, 26). In one carefully described example, DNA was extracted from 3 million PBMCs, of which 2 μg was used per PCR; the detection rate was 50% among 16 AIDS-KS patients (9). Prior to this work, we would have considered that to be both a large cell sample and a large amount of DNA to test by PCR. Unfortunately, according to our results, there would have been too few PBMCs in the bulk lysate and too few replicates to obtain a positive PCR result in some of our PCR-positive subjects. The number of cells originally lysed for DNA extraction, a critical variable needed to compare rates of detection reported from different studies, is seldom described (including in our own studies) (10). Here, we started from a lysate of 4.2×10^6 PBMCs and tested up to 7.4 μg per patient for those who were PCR positive. Even when these large amounts of DNA were used (or even larger quantities in the retests of subjects 1 and 2), three of nine KS subjects in our study were negative by PCR. Subject 4 went from negative to positive when the number of replicates was increased from 12 to 22, raising the possibility that other subjects with negative results would test positive if an even larger number of cells were sampled. Thus, HHV-8 PCR results obtained with more conventional sampling methods (single, small-volume specimens) are likely to have underestimated the prevalence of the virus in PBMCs.

Evidence for both lytic and latent infection in PBMCs. The measured mean virus loads per infected cell should not be interpreted as a homogeneous distribution of genomes in infected cells. Our results make it clear that there is almost certainly a sharp polarization between the copy number per latently infected cell and per lytically infected cell. The ratio between numbers of cells in these states is likely to vary over time. For example, induction of lytic HHV-8 replication in BCBL-1 cells (all of which harbor the virus) resulted in only a threefold increase in the mean net virus load (from 100 to 307 HHV-8 genomes per infected cell), even though lytically infected cells harbor on the order of 2,400 viral genomes per cell. Thus, even low elevations of the mean virus load, such as the threefold elevation seen in our BCBL-1 experiments, can represent substantial active virus replication in a small subset of cells. Among our study subjects, we saw up to 70-fold differ-

ences in mean virus loads per positive cell and hypothesize that (i) levels seen in some individuals of fewer than 10 genomic copies per infected cell represent tightly regulated latent infections and (ii) the highest mean virus loads (the data do not support defining a clear threshold) are likely to indicate appreciable lytic virus replication in PBMCs. The meaning of the intermediate values cannot be discerned at present. Interestingly, three of the eight subjects with PCR-positive PBMCs (and none of the subjects with PCR-negative PBMCs) were simultaneously PCR positive in their plasma, further supporting the idea that active virus replication was taking place, in agreement with other studies (12, 25). We cannot exclude the possibility that free virions in plasma may arise from noncirculating infected cells such as epithelial cells or vessel endothelial cells. However, all patients with detectable virus in plasma had positive PBMCs as well; free virions were not detected in any of the subjects with PCR-negative PBMCs.

The final point is that the lowest viral copy numbers per infected cell we observed (approximately three and six genomes per infected cell in patients 9 and 7) are substantially less than the copy number in latently infected BCBL-1 cells. This suggests that viral genome copy number is regulated differently in nontransformed cells during *in vivo* latency than in PEL cells. Thus, in analogy with EBV, HHV-8 may employ more than one latency program. Because of their low infected-cell frequencies, this will be particularly difficult to study in healthy, immunocompetent individuals. It is easy to forget that such individuals represent the predominant HHV-8-infected host phenotype.

In conclusion, our results suggest the following. (i) While laborious, the PCR-LDA method described here has clear value in monitoring HHV-8 activity and will be of use in studies of KS progression in a larger patient group. (ii) Standard methods for sampling PBMCs lead to underreporting of HHV-8 presence in circulating leukocytes. (iii) HHV-8 can persist in circulating latently infected B cells and is likely to undergo lytic replication in PBMCs; this may contribute to KS pathogenesis by delivering circulating infectious virus into tissues. (iv) *In vivo* HHV-8 latency may be regulated differently from latency in transformed cells. (v) Complementary approaches, such as further analysis of latent and lytic transcripts in PBMCs (25) and quantitative assessments of whether virus genomes are linear or circular (12), as well as assessment of the ratio of latent to lytically infected cells over time, will ultimately be needed to more fully understand the biology of HHV-8 in circulating leukocytes.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by a fellowship from Generalitat de Catalunya (AGAUR), Spain, and by funding from the CDC Opportunistic Infections Working Group.

We thank Karen McCaustland and Brian Holloway for developing and optimizing the RNase P single-plex reaction and their assistance with optimization of the duplex TaqMan PCR, Eng-Chun Mar for providing the *orf37*-pPICZ α A plasmid, Kay Radford and Tim Bailiff for performing HHV-8 serology and measuring HIV virus loads, Lee Lam for performing CD4 counts, David O. Willer from Sam Speck's laboratory for sharing their limiting dilution assay method, and Clifford J. Gunthel and the Grady Infectious Diseases Clinic staff for their cooperation and support with specimen collection.

REFERENCES

- Ambroziak, J. A., D. J. Blackburn, B. G. Herndier, R. G. Glogau, J. H. Gullett, A. R. McDonald, E. T. Lennette, and J. A. Levy. 1995. Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* **268**:582.
- Antman, K., and Y. Chang. 2000. Kaposi's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* **342**:1027–1038.
- Boivin, G., S. Cote, N. Cloutier, Y. Abed, M. Maguigad, and J. Routy. 2002. Quantification of human herpesvirus 8 by real-time PCR in blood fractions of AIDS patients with Kaposi's sarcoma and multicentric Castlemann's disease. *J. Med. Virol.* **68**:399–403.
- Boivin, G., A. Gaudreau, and J. P. Routy. 2000. Evaluation of the human herpesvirus 8 DNA load in blood and Kaposi's sarcoma skin lesions from AIDS patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **14**:1907–1910.
- Boivin, G., A. Gaudreau, E. Toma, R. Lalonde, J.-P. Routy, G. Murray, J. Handfield, and M. G. Bergeron. 1999. Human herpesvirus 8 DNA load in leukocytes of human immunodeficiency virus-infected subjects: correlation with the presence of Kaposi's sarcoma and response to anticytomegalovirus therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:377–380.
- Broccolo, F., G. Locatelli, L. Sarmati, S. Pierpaoli, F. Veglia, M. Andreoni, S. Buttò, B. Ensolì, P. Lusso, and M. S. Malnati. 2002. Calibrated real-time PCR assay for quantitation of human herpesvirus 8 DNA in biological fluids. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4652–4658.
- Browning, P. J., J. Sechler, M. Kaplan, R. Washington, R. Gendelman, R. Yarchoan, B. Ensolì, and R. C. Gallo. 1994. Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. *Blood* **84**:2711–2720.
- Campbell, T. B., M. Borok, L. Gwanzura, S. MaWhinney, I. E. White, B. Ndemera, I. Gudza, L. Fitzpatrick, and R. T. Schooley. 2000. Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage. *AIDS* **14**:2109–2116.
- Campbell, T. B., L. Fitzpatrick, S. MaWhinney, X. Zhang, and R. T. Schooley. 1999. Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) infection in men receiving treatment for HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **22**:333–340.
- Cannon, M. J., S. C. Dollard, J. B. Black, B. R. Edlin, C. Hannah, S. E. Hogan, M. M. Patel, H. W. Jaffe, M. K. Offermann, T. J. Spira, P. E. Pellett, and C. J. Gunthel. 2003. Risk factors for Kaposi's sarcoma in men seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *AIDS* **17**:215–222.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**:1865–1869.
- Decker, L. L., P. Shankar, G. Khan, R. B. Freeman, B. J. Dezube, J. Lieberman, and D. A. Thorley-Lawson. 1996. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J. Exp. Med.* **184**:283–288.
- Engels, E. A., R. J. Biggar, V. A. Marshall, M. A. Walters, C. J. Gamache, D. Whithy, and J. J. Goedert. 2003. Detection and quantification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to predict AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *AIDS* **17**:1847–1851.
- Grundhoff, A., and D. Ganem. 2004. Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J. Clin. Investig.* **113**:124–136.
- Iscovich, J., P. Boffetta, S. Franceschi, E. Azizi, and R. Sarid. 2000. Classic Kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer* **88**:500–517.
- Lallemant, F., N. Desire, W. Rozenbaum, J.-C. Nicolas, and V. Marechal. 2000. Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1404–1408.
- Laney, A. S. S. C. Dollard, H. W. Jaffe, M. K. Offermann, T. J. Spira, C. J. Gunthel, P. E. Pellett, and M. J. Cannon. 2004. Repeated measures study of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA and antibodies in men seropositive for both HHV-8 and HIV. *AIDS* **18**:1819–1826.
- Mesri, E. A., E. Cesarman, L. Arvanitakis, S. Rafii, M. A. Moore, D. N. Posnett, D. M. Knowles, and A. S. Asch. 1996. Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J. Exp. Med.* **183**:2385–2390.
- Min, J., and D. A. Katzenstein. 1999. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in peripheral blood cells in human immunodeficiency virus infection: association with Kaposi's sarcoma, CD4 cell count, and HIV RNA levels. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **15**:51–55.
- Miyashita, E., B. Yang, D. H. Crawford, and D. A. Thorley-Lawson. 1995. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**:593–601.
- Moore, P. S., and Y. Chang. 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, p. 2803–2833. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, B. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- O'Neill, E., J. L. Douglas, M.-L. Chien, and J. V. Garcia. 1997. Open reading frame 26 of human herpesvirus 8 encodes a tetradecanoyl phorbol acetate- and butyrate-inducible 32-kilodalton protein expressed in a body cavity-based lymphoma cell line. *J. Virol.* **71**:4791–4797.
- Pau, C. P., S. Lee-Thomas, W. Auwanit, J. George, C. Y. Ou, B. S. Parekh, T. Granade, D. Holloman, S. Phillips, and G. Schochetman. 1993. Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* **7**:337–340.
- Pellet, C., S. Chevet, L. Blum, C. Gauville, M. Hurault, F. Agbalika, C. P. D. Lascoux, P. Morel, F. Calvo, and C. Lebbe. 2001. Virologic and immunologic parameters that predict clinical response of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J. Investig. Dermatol.* **117**:858–863.
- Pellet, P. E., D. J. Wright, E. A. Engels, D. V. Ablashi, S. C. Dollard, B. Forghani, S. A. Glynn, J. J. Goedert, F. J. Jenkins, T.-H. Lee, F. Neipel, D. Todd, D. Whithy, G. Nemo, M. P. Busch et al. 2002. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of *Human herpesvirus 8* seroprevalence in US blood donors. *Transfusion (Paris)* **43**:1260–1268.
- Polstra, A., J. Goudsmit, and M. Cornelissen. 2003. Latent and lytic HHV-8 mRNA expression in PBMCs and Kaposi's sarcoma skin biopsies of AIDS Kaposi's sarcoma patients. *J. Med. Virol.* **70**:624–627.
- Quinlivan, E., C. Zhang, P. Stewart, C. Komoltri, M. Davis, and R. Wehbie. 2002. Elevated virus loads of Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus 8 predict Kaposi's sarcoma disease progression, but elevated levels of human immunodeficiency virus type 1 do not. *J. Infect. Dis.* **185**:1736–1744.
- Rodrigo, A., P. Goracke, K. Rowhanian, and J. Mullins. 1997. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **13**:737–742.
- Rowe, D. T., L. Qu, J. Reyes, N. Jabbour, E. Yunis, P. Putnam, S. Todo, and M. Green. 1997. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1612–1615.
- Rowe, D. T., S. Webber, E. Schauer, J. Reyes, and M. Green. 2001. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transplant Infect. Dis.* **3**:79–87.
- Sarid, R., S. J. Olsen, and P. S. Moore. 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv. Virus Res.* **52**:139–232.
- Spira, T. J., L. Lam, S. C. Dollard, Y.-X. Meng, C. P. Pau, J. B. Black, D. Burns, B. Cooper, M. Hamid, J. Huang, K. Kite-Powell, and P. E. Pellett. 2000. Comparison of serologic assays and PCR for diagnosis of human herpesvirus 8 infection. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2174–2180.
- Stamey, F. R., M. M. Patel, B. P. Holloway, and P. E. Pellett. 2001. Quantitative, fluorogenic probe PCR assay for detection of human herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3537–3540.
- Tedeschi, R., M. Enbom, E. Bidoli, A. Linde, P. De Paoli, and J. Dillner. 2001. Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4269–4273.
- Trippler, M., K. Meyer zum Buschenfelde, and G. Gerken. 1999. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J. Virol. Methods* **78**:129–147.
- Weck, K. E., S. S. Kim, H. W. Virgin IV, and S. H. Speck. 1999. B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency. *J. Virol.* **73**:4651–4661.
- Whithy, D., M. R. Howard, M. Tenant-Flowers, N. S. Brink, A. Copas, C. Bishoff, T. Hatzioannou, F. E. A. Suggett, D. M. Aldam, A. S. Denton, R. F. Miller, I. V. D. Weller, R. A. Weiss, R. S. Tedder, and T. F. Schultz. 1995. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* **346**:799–802.
- Yang, J., Q. Tao, I. W. Flinn, P. G. Murray, L. E. Post, H. Ma, S. Piantadosi, M. A. Caligiuri, and R. F. Ambinder. 2000. Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood* **96**:4055–4063.

Risk factors for human Herpesvirus 8 infection and AIDS – associated Kaposi’s sarcoma among men who have sex with men in a European multicenter case-control study (EuroShaks)

Martró E^{1,2}, Esteve A¹, Whitby D³, Schulz T⁴, Gambús G¹, Muñoz R¹, Boshoff C⁵ and Casabona J¹ for the Euro-Shaks study group.

¹ Centre d’Estudis Epidemiològics sobre l’HIV/SIDA de Catalunya, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ²Microbiology Service, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. ³Viral Epidemiology Section, AIDS vaccine Program, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, MD 21702. ⁴Department of Virology, Hannover Medical School, Hannover, Germany. ⁵Cancer Research UK, Viral Oncology Group, Wolfson Institute for Biomedical Research, Cruciform Building, Gower Street, University College London, London WC1E 6BT, UK.

Objective: to identify risk factors for the development of AIDS associated Kaposi’s sarcoma (KS) and to assess specific sexual practices as risk factors for Human herpesvirus 8 (HHV-8) infection, contributing to the understanding of transmission mechanisms for this virus among men who have sex with men (MSM). **Design:** European case-control study starting in 1994, in which each KS case was matched to two controls with the same AIDS stage and an AIDS indicative disease other than KS. Participants recruited in Spain were followed up until 2004 to study incident KS cases. **Methods:** HHV-8 seroprevalence was determined using a latent immunofluorescence assay. Relevant information was obtained by administering an extensive questionnaire and reviewing medical charts. The assessment of risk factors for KS development was performed using conditional logistic regression models. Moreover, unconditional logistic regression models were applied when both risk factors for HHV-8, and risk factors for KS development among the HHV-8 positive individuals are analyzed. **Results:** Sexual practices associated with KS in the analysis by triplets were no longer significant upon reanalysis among HHV-8 positive subjects only. Therefore, a low CD4 count was the only significant risk factor for progression to KS. On the other hand, HHV-8 infection was most strongly linked to orogenital receptive unprotected sex. HHV-8 seropositivity was also associated with the number of life-time sex partners and a history of STDs. Among controls, 12% and 5% of the subjects who were HHV-8 seropositive and seronegative at enrolment, respectively, developed KS during follow up. **Conclusions:** Our results confirm a sexual route of transmission for HHV-8 among MSM, and provide evidence for viral transmission through exposure of oral mucosa to semen. However, weaker associations involving contact with saliva were also found, showing that other routes may also play a role, like for other herpesviruses. Furthermore, KS incubation time in MSM with AIDS may range from a few months to more than 9 years. Finally, our results demonstrate a significant protective role for HAART both on KS development among HHV-8 seropositives, and on mortality of KS patients.

Kaposi’s sarcoma (KS), first described in 1872,¹ is an angioproliferative disease occurring in four clinical-epidemiological forms. Classic KS affects elderly men of Mediterranean or Jewish ancestries, endemic KS is found in equatorial Africa, iatrogenic KS occurs among immunosuppressed transplant recipients, and epidemic or AIDS-KS occurs in HIV-infected individuals and is the most aggressive one.^{2,3} Human Herpesvirus 8 (HHV-8), which was identified in AIDS-KS tissue in 1994,⁴ is necessary for the development of all forms of KS.⁵

KS was a relatively uncommon malignancy in industrialized countries before 1980. However, in the early 80s numerous cases of AIDS-KS among homosexual men arose in Europe and the US related to the HIV epidemic and the derived immunosuppression.⁶⁻⁸ AIDS-KS incidence decreased after that together with a decline in sexual promiscuity and the HIV incidence^{7,9,10}. KS incidence further diminished after HAART introduction in 1996,¹¹⁻¹³ probably due in part to enhanced immune reconstitution,¹⁴ and the direct effect of protease inhibitors as anti-angiogenic factors¹⁵. However, the proportion of AIDS diagnoses attributable to KS has not changed over time¹³, and KS is currently the sixth most common AIDS indicative disease and the first cause of

neoplasm among AIDS patients in Western Europe (HIV/AIDS Surveillance in Europe, End-year report 2002, No 68).

Regarding KS development, HIV infection has been suggested to contribute to the pathogenesis of KS in several ways; through immunosuppression, perturbation in the expression of certain cytokines, or the effect of HIV-1 Tat protein enhancing angiogenesis and as a transactivator of HHV-8 gene expression.^{16,17} Other factors have also been suggested to influence KS development, such as temporal order of HHV-8 and HIV infection,¹⁸ HIV or HHV-8 viral load,^{19,20} degree of immuno-suppression,⁸ and homosexual behavior.²¹ However, only 30 to 50% of men who are coinfecting with HHV-8 and HIV-1 develop KS within 10 years^{6,18,21,22} and, therefore, other risk factors might be involved.

Prevalence of HHV-8 infection and AIDS-KS incidence are disproportionately higher among homosexual and bisexual HIV positive men when compared to other HIV-risk groups, which has long suggested that HHV-8 can be sexually transmitted.²³⁻²⁶ However, identification of specific sexual practices among men who have sex with men (MSM) as risk factors for HHV-8 infection has been so far controversial due to many possible sources of bias in

these studies.²⁷ Besides, detection of HHV-8 DNA in semen, saliva and rectal specimens has also been variable.²⁸⁻³⁹

The aims of this study were firstly, to identify potential risk factors for KS development among AIDS patients and, more specifically, among those co-infected with HIV-1 and HHV-8. And secondly, to describe the potential transmission routes by which HHV-8 is acquired.

MATERIALS AND METHODS

Study design and inclusion criteria for patients. In 1992 a multi-centre matched case-control study funded by the European Union (EURO-SHAKS: European Study on HIV Associated Kaposi's Sarcoma, DG XII), was designed to identify potential biological, behavioural and environmental risk factors for HIV associated KS. Participant countries were Spain, Belgium, UK, Italy and Greece. Cases were defined as any AIDS patient with a clinical diagnosis of KS confirmed by microscopy (when possible), and controls as any AIDS patient with an indicative disease other than KS or with a CD4 cell count of less than 200⁴⁰ who had been diagnosed ± 4 months from the date of the case diagnosis. Each case was matched with two controls by sex, age and transmission category. All participants signed an informed consent form before enrolling in the study.

In 1998, after the discovery of HHV-8,⁴ sera samples from both cases and controls were tested for HHV-8. Since then, the Spanish study controls have been followed up yearly, by means of contacting the responsible physician and a systematically reviewing medical records. Information regarding occurrence of KS, vital status, and exposure to HAART have been collected for these participants.

Clinical specimens and HHV-8 diagnostic methods. Peripheral blood was drawn from all participants, in order to obtain blood clots, serum, plasma and purified lymphocytes.⁴¹ Serum specimens were stored at -20°C and tested for the presence of antibodies against HHV-8 using three serologic assays: two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for ORF73/LANA and for the lytic antigen ORF65, and an immunofluorescence assay (IFA) for the latency associated nuclear antigen (LANA) encoded by *orf73*, as previously described. For the present study, only IFA results were used. Similar findings were obtained using a serological algorithm in which a specimen was considered positive if reactive in any of the three assays (data not shown).

Data collection. Demographic and behavioural data were collected from all participants by means of a personal interview performed by a single trained person. No personal identifier was used. Clinical data were collected by a standardized review of medical records. Behavioural questionnaires referred to two different recall periods. Period 1 was referred to the two previous years before KS diagnosis; period 2 was referred to the 9th and 10th years previous to KS diagnosis. Although the original

aim of the 2 recall periods was to identify potential changes on behaviour that could be used as a surrogate for exposure to the KS putative agent, for the purpose of this study, only data from the second period was considered as several studies have shown that the time from HHV-8 seroconversion to KS may be around a decade.

Men were asked about their medical history during the 10 years previous to the AIDS diagnosis; for statistical purposes, all sexually transmitted infections (STD) were introduced as a single variable defined as the number of STD (ranging from 0 to 4), and cancer or cancerous lesions were coded as yes or no. The questionnaire also included behavior regarding alcohol consumption and smoking cigarettes referred to the second study period. For analysis, the number of alcoholic drinks a week and the number of cigarettes per day was computed and recoded, respectively, in several categories. Concerning sexual behavior, men who claimed having had sex with other men were asked about the number of male partners in their lifetime. Additionally, they were asked how often they practiced orogenital or oroanal sex, or anal intercourse without condom during the first and second study periods. Men answered on a 4-point scale (0 = "never", 1 = "less than once a month", 2 = "once a month or more but less than once a week", 3 = "more than once a week"). For the present analysis responses coded as 2 and 3 were grouped into a single category ("once a month or more").

Statistical analysis. Conditional logistic regression models⁴² were used to study risk factors associated with KS development in the initial matched case-control design (analysis 1). Moreover, unconditional logistic regression models were performed when determinants for KS development among HHV-8 seropositive individuals (analysis 2), and risk factors for HHV-8 infection (analysis 3), were analyzed given that (unmatched) case-control designs were considered. In the three analysis the following strategy was considered: all variables with a significant unadjusted odds ratio at level 0.15 were included in the initial multivariate model in order to take into account potential confounding variables. In the most parsimonious final multivariate model variables with a p-value greater than 0.15 were considered depending on the change in Deviance statistic value. Odds ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (95% CI) were computed. Follow-up of Spanish controls was censored in March 2004. Cumulative incidence rates of KS development, as well as cumulative mortality rates, were computed and expressed as rates/1,000 men. The cumulative probability of having a KS diagnosis among HHV-8 seropositive and seronegative men at the time of enrollment was estimated using the Kaplan-Meier method and compared through the log-rank test. Incidence rate ratios of KS development and 95% CI were also computed in HHV-8 seropositive men compared to those in HHV-8 seronegative at the time of enrollment.

RESULTS

Study population. All 483 participants were men and the distribution by route of HIV acquisition reported by physicians was predominantly homosexual (91.3%),

followed by intravenous drug use (4.3%), heterosexual (1.2%), transfusion reception (1.2%) and unknown route (1.9%). For the current study, only the triplets (one case and two matched controls) of men who reported having had sex with other men (MSM) in the questionnaire were included in the statistical analysis (n=426, 142 cases and 284 controls). Mean age at the time of diagnosis was 38.0 years both for cases and controls, since age was used as a criterion for matching. Regarding country of enrolment, 6 triplets were recruited in the UK, 6 in Greece, 9 in Italy, 17 in Belgium, and 104 (73%) in Spain. Among Spanish enrollees, 227 subjects without KS at study entry (controls) were followed up to assess KS incidence and the mortality rate.

Analysis of risk factors for KS development. An IFA positive result was highly associated with the presence of KS (OR of 4.82, 95% CI: 2.85-8.14). When risk factors were assessed using the matched case-control design, significant associations were found between KS and some of the variables including certain sexual practices in the univariate analysis (Table 1). Low CD4 counts, a high number of life-time sexual partners, and the practice of orogenital receptive unprotected sex were still significant in the multivariate analysis. On the other hand, when risk factors were assessed among HHV-8 seropositive individuals, the only significant risk factor for disease development was having a low CD4 count, which was still significant when adjusted by age at KS diagnosis. The consume of alcohol, tobacco, or having had cancer were not significantly associated with KS.

Associations with specific sexual behaviors in the first period (during the 2 years previous to AIDS diagnosis) were not found to be significant for KS development neither in the overall sample nor among HHV-8 seropositive individuals (data not shown).

Analysis of risk factors for HHV-8 infection. Twenty-three out of 426 study participants were excluded because insufficient serum was available and, therefore, 403 subjects were included in subsequent analyses. The HHV-8 positive group was constituted by all KS cases, who are therefore infected with HHV-8, plus those controls that were HHV-8 seropositive (105 out of 267, 39%).

HHV-8 infection was significantly higher among men who had had more than 50 sexual life-time partners. When data from the second study period (years 9 and 10 before the diagnosis of AIDS) was analyzed, a univariate significant association was found with certain sex practices: orogenital insertive and receptive, oroanal receptive, and anogenital receptive unprotected sex (Table 2). In the multivariate model, the number of STD and the number of lifetime sexual partners were statistically associated with HHV-8 infection. Regarding specific sexual practices, only orogenital receptive sex remained in the model (Table 2). On the other hand, no significant associations between specific sexual behaviors and HHV-8 seropositivity were detected when data from the first period was used (results not shown).

Longitudinal follow-up. Since a percentage of the controls (HIV-infected MSM free of KS) were HHV-8 seropositive, those enrolled in Spain (n=227) were followed up twice a year until May 2004 to assess KS incidence and the mortality rate. Subjects that were lost over the first year after study entry (n=7) were excluded from the analysis. The rest (n=220) were followed up until their death or lost of follow-up, for a median time of 7 years (range, 0.03-10.23 years).

Over this period, 16 (7.3%) subjects developed KS, including 9 (11.0%) individuals out of 82 HHV-8 seropositives and 7 (5.1%) out of 138 HHV-8 seronegatives at study entry. Accumulated KS incidence was thus 2.0 and 1.0 per 100 persons-year, respectively. Median time from study entry to KS development was 11.8 months (range, 1 month to 4.5 years) and, according the HHV-8 status at study entry, this time was 10.0 and 23.1 months for HHV-8 seropositives and seronegatives, respectively. Fig 1 shows Kaplan-Meier estimates of the accumulated probability of remaining KS free from enrollment in the cohort according to HHV-8 serostatus at study entry. The relative risk for KS development among HHV-8 seropositive was not significantly higher than in patients who were seronegative at enrolment (2.0, 95% CI: 0.7-5.3). For 171 of the Spanish controls, information was available regarding whether they had started HAART and when. Once this variable was taken into account, among the 167 subjects who were free of KS before starting HAART, KS incidence was 0.8 per 100 persons-year in IFA-positive individuals who had started HAART and 8.0 per 100 persons-year those IFA-positives who had not. Therefore, the relative risk of developing KS among HHV-8 seropositive individuals that were not on HAART was 10.5 (95% CI: 1.1-101.2) when compared to those who had started HAART.

Concerning mortality, 86 subjects (39.1%) died in a median time of 15.6 months (range, 0.4 months to 8.2 years). The mortality rate was higher among subjects who had developed KS (15.8 per 100 persons-year) than in those who had not (6.8 per 100 persons-year). The relative risk of death in subjects with KS vs. those without was therefore statistically significant (2.3, 95% CI: 1.2-4.5). Moreover, when the relative risk of death was computed taking into account whether these patients had started HAART or not results increased to 9.6 (95% CI: 3.2-28.1). Among patients with KS, only 4 out of 9 subjects that had started HAART died, while all 5 who had never been on HAART did. Not having started HAART was a risk factor for death, both for subjects with KS (RR=6.26; 95% CI: 1.7-23.3) and without (RR=44.5; 95% CI: 23.1-85.5).

DISCUSSION

The present European multicentric case-control study was designed to assess risk factors for KS among HIV-positive subjects by means of a comprehensive questionnaire. Recruitment of cases and matched controls started before HHV-8 was first identified and, therefore, enrolment criteria were set on presence or absence of KS regardless of HHV-8 infection. Later serology testing revealed that 39% of the controls were actually HHV-8 seropositive. This fact enabled us to look at risk factors for

KS development among HHV-8 and HIV-1 coinfecting MSM, as well as risk factors for HHV-8 infection. We also followed-up participants enrolled in Spain for up to 10 years, which made possible to assess KS incidence.

Risk factors for KS development. Study design is of utmost importance to assess risk factors for KS development. Early studies analyzed individuals with and without KS despite of HHV-8 serostatus and attempted to identify risk factors among a variety of specific homosexual activities.⁴³⁻⁴⁵ However, the KS-negative group might have included both HHV-8 positive (who were therefore at risk for KS) and negative subjects, as happened in our study, and therefore risk factors for KS development are probably confounded with those actually related to HHV-8 infection.

Related to this, our study shows that sexual practices originally identified as risk factors for KS were no longer significant when data was reanalyzed taking HHV-8 infection into account. This may be because specific sexual behaviors, while related to HHV-8 infection, might not play a direct role in the development of KS.¹⁸ We only found a significant association between KS and low CD4 counts, in agreement with other studies.^{8,13,21,39,46} Another risk factor for KS among the Spanish study participants was already described; HLA-DRB1 showed a possible role in the development of disease, indicating that progression to SK may depend on host factors controlling the immunoresponse against HHV-8.⁴⁷

Risk factors for HHV-8 infection. The disproportionate prevalence of HHV-8 infection and KS incidence among homosexual and bisexual HIV-positive men compared to other HIV risk groups, has long suggested that HHV-8 can be sexually transmitted.²³⁻²⁵ In our study in MSM with AIDS, a strong association between HHV-8 sero-positivity and number of life-time sex partners as well as the number of sexually transmitted diseases were found, which further confirms similar results obtained in previous studies. The presence of antibodies against HHV-8 was found to strongly correlate with homosexual activity, number of homosexual partners, promiscuity, duration of homosexual life, contact with US homosexual communities^{7,22} and a history of STD including HIV.⁶

In the current study, HHV-8 infection among MSM was most strongly associated with orogenital receptive unprotected sex. Although not significant in multivariate analysis, other sexual behaviors were associated with HHV-8 seropositivity in the univariate analysis, including orogenital insertive, anogenital receptive and oroanal receptive sex without condom. While HHV-8 infection has been linked to homosexual behavior,^{7,22,48} association with specific sexual practices has been so far controversial regarding oroanal sex,^{6,7,43,49,50} anogenital sex^{7,51-53} and orogenital sex.^{53,54} Cross-sectional risk factor analyses that attempt to determine the mode of transmission should be interpreted with caution because the moment of infection is unknown and sexual behavior may change over time. However, we assessed associations with sexual behavior in two time periods, and after statistical analysis only

variables in the second period (years 9 and 10 before the AIDS diagnosis) were significantly associated with HHV-8 seropositivity, and therefore were most likely to reflect the behavior around the time of HHV-8 acquisition. While data obtained by studies including subjects with known HHV-8 seroconversion dates is more reliable, only a few such studies are available. Duckers et al.⁵³ found no evidence that anogenital and oroanal insertive sex were related to HHV-8 seroconversion while orogenital receptive and insertive sex were significantly associated, similar to our results.

Our results suggest that sexual transmission of HHV-8 is likely to occur by exposure to seminal fluid through orogenital and less likely anogenital receptive routes, as previously suggested. Although HHV-8 has only been detected in the minority of semen samples from KS patients and homosexual men without KS,²⁸⁻³⁰ and in prostate specimens of AIDS-KS patients by PCR,³⁷ apparently, there may be intermittent viral shedding from a latent reservoir of HHV-8 in the prostate tissue of HIV-infected men with KS, which is influenced by host immunity like for other herpesviruses.³⁸ On the other hand, HHV-8 is also shed in saliva^{55,56} like other herpesviruses (HSV, CMV, EBV, HHV-6 and 7) and it has been frequently detected in oral fluids by PCR or culture.^{32,33,36,39}

This fact could provide a possible explanation for the identification in our study of a weak association of infection with orogenital insertive and oroanal receptive unprotected sex. Actually, HHV-8 is thought to be transmitted through saliva among children in Africa⁵⁷ and viral shedding in the oral cavity is also likely to be involved in transmission among HHV-8 positive men.³⁶ Finally, we found no significant associations of HHV-8 infection with sexual practices involving contact with fecal material, which is in agreement with the findings that HHV-8 DNA is rare in rectal specimens.^{36,39} Likewise, Melbye *et al.*⁷ found no significant correlation between oroanal insertive intercourse and either incident or prevalent HHV-8 infection.

Longitudinal follow-up of Spanish cases. As reported in several studies, 30 to 50% of HHV-8 and HIV co-infected men develop KS within 5 or 10 years of dual infection.^{6,18,21,22,58,59} Although KS incidence tends to be higher among individuals in advanced stages of AIDS than in recent HIV seroconvertors,^{21,21} only 11% of our HHV-8 positive AIDS patients had developed KS at the end of follow up (up to 10 years). Interestingly, 80% of those who did not develop KS were on HAART.

Regarding serostatus at study entry, the fact that HHV-8 positive controls were only 2-fold more likely to develop KS than seronegatives might have been due, in part, to a confounding effect played by the progressive availability of HAART, decreasing KS incidence among HHV-8 positive patients. In fact, our results demonstrate a significant protective role for HAART both on KS development among HHV-8 seropositives, and on mortality of KS patients. These results are in agreement with studies that have shown that relatively long periods of HAART result in immunoreconstitution, undetectable HHV-8 viremia, KS regression and a better clinical outcome in patients with KS.^{60,61} Follow-up also revealed 7 (5%) incident KS cases among the 138 controls that were HHV-8 seronegative at

enrolment. This implies that HHV-8 seroconversion as well as disease development could have occurred within the study period (median time from study entry to KS development for these patients was 23 months, range 6.4-54 months). This is in agreement with previous results showing that seroconversion may occur a few months before the onset of KS.²⁴ In fact, KS develops more rapidly (i.e. 1 to 4 years) in HIV positive subjects who later seroconvert to HHV-8.^{8,16,18,18} Alternatively, these subjects could have been false negative serology results reflecting a poor antibody response in immunocompromised persons (CD4 count ranged from 1 to 1341 cells/ μ l, median 63 cells/ μ l) or the insensitivity of the serology tests used. The latter would imply a low prognostic value of antibodies to LANA. In fact, 7 out of 16 KS cases (44%) had a negative serology test and were considered false negatives since HHV-8 DNA can be detected by PCR in lesions of virtually all patients.^{4,62} This percentage of false negatives was somewhat higher than that of other studies that detected HHV-8 antibodies in 80% of HIV-positive patients with KS using similar serology techniques.^{6,23,63,64}

Accurately determining the KS incubation period was not possible in our study because HHV-8 seroconversion dates were unknown. However, according to our results, this period may be longer than 6 to 9 years for those AIDS patients that were HHV-8 seropositive at enrolment and had no sign of KS at the end of follow-up. As previously reported, the KS incubation period may vary widely. Studies performed on MSM with AIDS in which HHV-8 seroconversion dates were known, have estimated KS incubation time in 33 months (6 months to 6.3 years).⁶⁵ On the other hand, for HIV-positive MSM without AIDS, this period has been estimated in 4.2 years (1.4 to 7.6 years) since HHV-8 seroconversion.²¹ In some other studies, HHV-8 seroconversion date was unknown for some or all participants and assumed to be enrolment date; O'Brien et al.⁶ reported a median time of 63.5 months (range, 15 months to 12.8 years), while Martin et al.²² reported a median time close to 10 years although

some subjects could have both seroconverted and developed KS within shorter times.

In conclusion, the association of seropositivity with the number of sex partners and a history of STDs found in our study confirms that HHV-8 is sexually transmitted among HIV positive MSM. Furthermore, this study points out to specific routes for HHV-8 transmission, even when the *imperfect* sensitivity of the serologic assay used might have resulted in an attenuation of associations. Since sexual practices implying exposure of oral and/or anal mucosa to semen and/or saliva were only significant in the univariate analysis, having unprotected orogenital receptive sex was the practice most strongly related to risk for HHV-8 infection. Accumulating evidence suggests that HHV-8 infection may have multiple transmission routes like other herpesviruses that are transmitted both by salivary and sexual contact (i.e. Cytomegalovirus, Herpes simplex virus 1 and 2). However, the fact that the virus is intermittently shed in semen and saliva of infected individuals,^{32,34} and that HHV-8 is confined in high risk populations and especially MSM in non-endemic countries, suggests that transmission may be inefficient. The main risk factors for KS development among HHV-8 seropositive AIDS patients were a low CD4 count and not being on HAART. KS incubation time in MSM with AIDS may range from a few months to more than 9 years. Finally, our results demonstrate a significant protective role for HAART both on KS development among HHV-8 seropositives, and on mortality of KS patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank to all participating centers. This project was partly funded by the DG XII of the European Commission (Euro-shaks), the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and Laboratories MSD (Madrid, Spain). We also acknowledge the support given by the CIRIT and the Health Department (Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain) and the U.K. Medical Research Council.

Table 1. Risk factors for AIDS associated Kaposi's sarcoma (univariate and multivariate analysis).

	Case – control design				Among HHV-8 positive only			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
CD4 count at KS diagnosis								
≥301	1		1		1		1	
201-300	1.89 (0.78-4.57)	0.155	2.07 (0.80-5.35)	0.133	1.92 (0.69-5.39)	0.214	1.99 (0.68-5.80)	0.211
101-200	1.74 (0.84-3.63)	0.137	2.13 (0.95-4.81)	0.066	1.82 (0.77-4.31)	0.172	1.79 (0.74-4.36)	0.200
≤100	2.28 (1.15-4.50)	0.018	2.59 (1.21-5.57)	0.014	3.71 (1.62-8.52)	0.002	3.33 (1.43-7.76)	0.005
Alcohol¹								
≤2	1				1			
3-7	0.78 (0.39-1.57)	0.702			0.66 (0.29-1.49)	0.317		
>=8	0.98 (0.53-1.80)	0.700			0.77 (0.38-1.55)	0.457		
Tobacco²								
≤10	1				1			
10-20	1.08 (0.56-2.10)	0.815			0.88 (0.42-1.85)	0.735		
>=21	1.09 (0.52-2.28)	0.831			0.95 (0.44-2.05)	0.896		
Cancer³	0.83 (0.20-3.49)	0.803			0.43 (0.04-4.16)	0.463		
Age at KS diagnosis	0.99 (0.96-1.04)	0.834			0.98 (0.95-1.00)	0.137		
NSTD	1.01 (0.91-1.12)	0.887			1.03 (0.83-1.28)	0.772		
Sexual partners during life								
≤50	1		1		1			
50-300	1.72 (0.91-3.28)	0.100	1.64 (0.79-3.42)	0.188	0.58 (0.26-1.32)	0.194		
301-600	1.61 (0.77-3.37)	0.211	2.48 (1.08-5.71)	0.032	0.73 (0.28-1.92)	0.520		
≥601	2.48 (1.30-4.72)	0.006	3.63 (1.65-8.01)	0.001	0.75 (0.33-1.73)	0.505		
Anogenital insertive sex								
<i>Never</i>	1				1			
Less than once a month	1.93 (1.04-4.33)	0.038			1.37 (0.67-2.82)	0.391		
Once a month or more	1.75 (1.00-3.08)	0.050			1.37 (0.74-2.54)	0.318		
Anogenital receptive sex								
<i>Never</i>	1				1			
Less than once a month	1.78 (0.95-3.31)	0.071			1.19 (0.58-2.46)	0.634		
Once a month or more	1.30 (0.78-2.15)	0.310			1.22 (0.65-2.29)	0.527		
Orogenital receptive sex								
<i>Never</i>	1		1		1			
Less than once a month	3.20 (1.42-7.22)	0.005	2.72 (1.11-6.67)	0.030	2.43 (0.87-6.80)	0.092		
Once a month or more	1.56 (0.84-2.93)	0.162	1.32 (0.63-2.77)	0.458	1.11 (0.50-2.46)	0.792		
Orogenital insertive sex								
<i>Never</i>	1				1			
Less than once a month	1.31 (0.51-2.88)	0.485			0.54 (0.25-2.04)	0.535		
Once a month or more	1.03 (0.67-1.88)	0.926			0.12 (0.24-1.18)	0.121		
Oroanal receptive sex								
<i>Never</i>	1				1			
Less than once a month	1.19 (0.69-2.04)	0.530			0.74 (0.39-1.42)	0.368		
Once a month or more	1.26 (0.73-2.16)	0.409			0.86 (0.43-1.72)	0.675		
Oroanal insertive sex								
<i>Never</i>	1				1			
Less than once a month	0.78 (0.42-1.43)	0.417			0.44 (0.22-0.88)	0.020		
Once a month or more	0.89 (0.51-1.57)	0.688			0.61 (0.30-1.23)	0.166		

¹Number of alcoholic drinks for a week; ²Number of cigarettes per day; ³ Any type of cancerous lesion.

Table 2. Risk factors for HHV-8 (univariate and multivariate analysis).

	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
CD4 count at KS diagnosis				
≥301	1			
201-300	0.94 (0.52-1.70)	0.827		
101-200	1.77 (0.85-3.71)	0.129		
≤100	1.54 (0.92-2.58)	0.097		
Alcohol¹				
=<2	1			
3-7	0.83 (0.45-1.54)	0.555		
>=8	0.97 (0.56-1.68)	0.911		
Tobacco²				
=<10	1			
10-20	0.95 (0.53-1.73)	0.873		
>=21	0.92 (0.50-1.70)	0.794		
Cancer³	1.12 (0.25-5.06)	0.885		
Age at KS diagnosis	1.02 (0.99-1.04)	0.084		
NSTD	1.34 (1.11-.62)	0.002	1.25 (1.02 , 1.53)	0.031
Sexual partners during life				
≤50	1		1	
50-300	2.68 (1.57-4.58)	<0.001	2.52 (1.27 , 4.00)	0.006
301-600	2.72 (1.37-5.36)	0.004	2.50 (1.18 , 5.30)	0.016
≥601	5.76 (3.10-10.72)	<0.001	5.46 (2.73 , 10.91)	<0.001
Anogenital insertive sex				
<i>Never</i>	1			
Less than once a month	1.64 (0.93-2.88)	0.085		
Once a month or more	1.49 (0.94-2.37)	0.093		
Anogenital receptive sex				
<i>Never</i>	1			
Less than once a month	1.82 (1.01-3.28)	0.045		
Once a month or more	1.20 (0.76-1.92)	0.436		
Orogenital receptive sex				
<i>Never</i>	1		1	
Less than once a month	2.48 (1.20-5.13)	0.014	2.18 (0.99 , 4.81)	0.053
Once a month or more	2.32 (1.35-3.99)	0.002	1.49 (0.81 , 2.75)	0.202
Orogenital insertive sex				
<i>Never</i>	1			
Less than once a month	1.59 (0.77-3.273)	0.213		
Once a month or more	1.88 (1.10-3.22)	0.022		
Oroanal receptive sex				
<i>Never</i>	1			
Less than once a month	1.95 (1.13-3.37)	0.017		
Once a month or more	1.44 (0.34-2.49)	0.186		
Oroanal insertive sex				
<i>Never</i>	1			
Less than once a month	1.65 (0.91-)	0.097		
Once a month or more	1.19 (0.69-)	0.531		

¹ Number of alcoholic drinks for a week; ² Number of cigarettes per day;

REFERENCES

- Chatlynne, L. G. and D. V. Ablashi. 1999. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin. Cancer Biol.* 9:175-185.
- Bayley, A. C., R. Cheingsong-Popov, A. G. Dalglish, R. G. Downing, R. S. Tedder, and R. A. Weiss. 1985. HTLV-III serology distinguishes atypical and endemic Kaposi's sarcoma in Africa. *Lancet* 359-361.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotropic viruses. [67]. 1996. Lyon, International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles, and P. S. Moore. 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869.
- Sarid, R., S. J. Olsen, and P. S. Moore. 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology, virology, and molecular biology. *Adv. Virus Res.* 52:139-232.
- O'Brien, T. R., D. Kedes, D. Ganem, D. R. Macrae, P. S. Rosenberg, J. Molden, and J. J. Goedert. 1999. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors, and relationship to Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 180:1010-1017.
- Melbye, M., P. M. Cook, H. Hjalgrim, K. Begtrup, G. R. Simpson, R. J. Biggar, P. Ebbesen, and T. F. Schulz. 1998. Risk factors for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) seropositivity in a cohort of homosexual men, 1981-1996. *Int J Cancer* 77:543-548.
- Renwick, N., T. Halaby, G. J. Weverling, N. H. T. M. Dukers, G. R. Simpson, R. A. Coutinho, J. M. A. Lange, T. F. Schulz, and J. Goudsmit. 1998. Seroconversion for human herpesvirus 8 during HIV infection is highly predictive of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 12:2481-2488.
- Casabona, J., M. Melbye, and R. J. Biggar. 1991. Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in European AIDS cases: no excess risk of Kaposi's sarcoma in mediterranean countries. *Int J Cancer* 47:49-53.
- Rezza, G., M. Dorrucchi, D. Serraino, M. Andreoni, M. Giuliani, R. Zerboni, L. Sarmati, V. Colangeli, B. Salassa, P. Monini, B. Ensoli, P. Pezzotti, and Italian Seroconversion Study. 2000. Incidence of Kaposi's sarcoma and HHV-8 seroprevalence among homosexual men with known dates of HIV seroconversion. Italian Seroconversion Study. *AIDS* 14:1647-1653.
- Gates, A. E. and L. D. Kaplan. 2002. AIDS malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Oncology (Huntingt)* 16:657-665.
- Ives, N. J., B. G. Gazzard, and P. J. Easterbrook. 2001. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. *J. Infect.* 42:134-139.
- Mocroft, A., O. Kirk, N. Clumeck, P. Gargalianos, H. Trocha, N. Chentsova, F. Antunes, H.-J. Stellbrink, A. N. Phillips, and J. D. Lundgren. 2004. The changing pattern of Kaposi sarcoma in patients with HIV, 1994-2003. The EuroSIDA study. *Cancer* 100:On line.
- Anderson, J. E., R. W. Wilson, P. Barker, L. Doll, T. S. Jones, and D. Holtgrave. 1999. Prevalence of sexual and drug-related HIV risk behaviors in the U.S. adult population: results of the 1996 National Household Survey on Drug Abuse. *J Acquir Immune Defic Syndr* 21:148-156.
- Sgadari, C., P. Monini, G. Barillari, and B. Ensoli. 2003. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.* 4:537-547.
- Gnann, J. W., Jr., P. E. Pellett, and H. W. Jaffe. 2000. Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 30:S72-S76.
- Huang, L. M., M. F. Chao, M. Y. Chen, H. Shih, Y. P. Chiang, C. Y. Chuang, and C. Y. Lee. 2001. Reciprocal regulatory interaction between human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* 276:13427-13432.
- Jacobson, L. P., F. J. Jenkins, G. Springer, A. Muñoz, K. V. Shah, J. Phair, Z.-F. Zhang, H. Armenian, and Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) (United States). 2000. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 181:1940-1949.
- Jacobson, L. P., T. E. Yamashita, R. Detels, J. B. Margolick, J. S. Chmiel, L. A. Kingsley, S. Melnick, and A. Munoz. 1999. Impact of potent antiretroviral therapy on the incidence of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphomas among HIV-1-infected individuals. Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 21 Suppl 1:S34-S41.
- Campbell, T. B., M. Borok, L. Gwanzura, S. MaWhinney, I. E. White, B. Ndemera, I. Gudza, L. Fitzpatrick, and R. T. Schooley. 2000. Relationship of human herpesvirus 8 peripheral blood virus load and Kaposi's sarcoma clinical stage. *AIDS* 14:2109-2116.
- Rezza, G., M. Andreoni, M. Dorrucchi, P. Pezzotti, P. Monini, R. Zerboni, B. Salassa, V. Colangeli, L. Sarmati, E. Nicastri, M. Barbanera, R. Pristera, F. Aiuti, L. Ortona, B. Ensoli, and Italian Seroconversion Study. 1999. Human herpesvirus 8 seropositivity and risk of Kaposi's sarcoma and other acquired immunodeficiency syndrome-related diseases. *J Natl Cancer Inst* 91:1468-1474.
- Martin, J. N., D. E. Ganem, D. H. Osmond, K. A. Page-Shafer, D. Macrae, and D. H. Kedes. 1998. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 338:948-954.
- Kedes, D. H., E. Operskalski, M. P. Busch, R. P. Kohn, J. Flood, and D. E. Ganem. 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.
- Gao, S.-J., L. A. Kingsley, M. Li, W. Zheng, C. Parravicini, J. L. Ziegler, R. Newton, C. R. Rinaldo, A. J. Saah, J. P. Phair, R. Detels, Y. Chang, and P. S. Moore. 1996. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 2:925-928.
- Lenette, E. T., D. J. Blackbourn, and J. A. Levy. 1996. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 348:858-861.
- Gambús, G., D. Bourboulia, A. Esteve, R. Lahoz, C. Rodríguez, F. Bolao, G. Sirera, R. Muga, J. del Romero, C. Boshoff, D. Whitby, and J. Casabona. 2001. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *AIDS* 15:1167-1174.
- Martin, J. N. and D. H. Osmond. 2000. Invited commentary: Determining specific sexual practices associated with human herpesvirus 8 transmission. *Am J Epidemiol* 151:225-229.
- Monini, P., L. de Lellis, M. Fabris, F. Rigolin, and E. Cassai. 1996. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences in prostate tissue and human semen. *N Engl J Med* 334:1168-1172.

29. Howard, M. R., D. Whitby, G. Bahadur, F. Suggett, C. H. Boshoff, M. Tenant-Flowers, T. F. Schulz, S. Kirk, S. Matthews, I. V. D. Weller, R. S. Tedder, and R. A. Weiss. 1997. Detection of human herpesvirus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. *AIDS* 11:F15-F19.
30. Gupta, P., M. K. Singh, C. Rinaldo, M. Ding, H. Farzadegan, A. Saah, D. Hoover, P. Moore, and L. Kingsley. 1996. Detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus DNA in semen of homosexual men with Kaposi's sarcoma [letter]. *AIDS* 10:1596-1598.
31. Corbellino, M., C. Parravicini, J. T. Aubin, and E. Berti. 1996. Kaposi's sarcoma and herpesvirus-like DNA sequences in sensory ganglia [letter]. *N Engl J Med* 334:1341-1342.
32. Koelle, D. M., M.-L. Huang, B. Chandran, J. Vieira, M. Piepkorn, and L. Corey. 1997. Frequent detection of Kaposi's sarcoma -- associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in saliva of human immunodeficiency virus -- infected men: clinical and immunologic correlates. *J Infect Dis* 176:94-102.
33. Vieira, J., M.-L. Huang, D. M. Koelle, and L. Corey. 1997. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol* 71:7083-7087.
34. Diamond, C., M.-L. Huang, D. H. Kedes, C. Speck, G. W. Rankin, Jr., D. Ganem, R. W. Coombs, T. M. Rose, J. N. Krieger, and L. Corey. 1997. Absence of detectable human herpesvirus 8 in the semen of human immunodeficiency virus-infected men without Kaposi's sarcoma. *J Infect Dis* 176:775-777.
35. Blackburn, D. J. and J. A. Levy. 1997. Human herpesvirus 8 in semen and prostate [editorial comment]. *AIDS* 11:249-250.
36. Pauk, J., M.-L. Huang, S. J. Brodie, A. Wald, D. M. Koelle, T. Schaker, C. Celum, S. Selke, and L. Corey. 2000. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* 343:1369-1377.
37. Corbellino, M., G. Bestetti, M. Galli, and C. Parravicini. 1996. Absence of HHV-8 in prostate and semen. *N. Engl. J. Med.* 335:1237-1239.
38. Diamond, C., S. J. Brodie, J. N. Krieger, M. L. Huang, D. M. Koelle, K. Diem, D. Muthui, and L. Corey. 1998. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 72:6223-6227.
39. Cannon, M. J., S. C. Dollard, J. B. Black, B. R. Edlin, C. Hannah, S. E. Hogan, M. M. Patel, H. W. Jaffe, M. K. Offermann, T. J. Spira, P. E. Pellett, and C. J. Gunthel. 2003. Risk factors for Kaposi's sarcoma in men seropositive for both human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus. *AIDS* 17:215-222.
40. Centers for Disease Control and Prevention (United States). 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 41:1-19.
41. Casabona, J., G. Gambús, M. Vall, and A. Rodés. 1997. Risk factors for AIDS associated Kaposi's sarcoma. *Pathology Oncology Research* 3:74-77.
42. Hosmer, D. W., Jr. and S. Lemeshow. 1989. Applied logistic regression. John Wiley & Sons, New York.
43. Beral, V., D. Bull, S. C. Darby, I. V. D. Weller, C. A. Carne, M. Beecham, and H. W. Jaffe. 1992. Risk of Kaposi's sarcoma and sexual practices associated with faecal contact in homosexual or bisexual men with AIDS. *Lancet* 339:632-635.
44. Kaldor, J. M., B. Tindall, P. Williamson, J. Elford, and D. A. Cooper. 1993. Factors associated with Kaposi's sarcoma in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6:1145-1149.
45. Armenian, H. K., D. R. Hoover, S. Rubb, S. Metz, R. Kaslow, B. Visscher, J. Chmiel, L. Kingsley, and A. Saah. 1993. Composite risk score for Kaposi's sarcoma based on a case-control and longitudinal study in the Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) population. *Am. J. Epidemiol.* 138:256-265.
46. Hoover, D. R., C. A. Black, L. P. Jacobson, O. Martínez Maza, D. Seminara, A. J. Saah, J. Von Roenn, R. Anderson, and H. K. Armenian. 1993. Epidemiologic analysis of Kaposi's sarcoma as an early and later AIDS outcome in homosexual men. *Am J Epidemiol* 138:266-278.
47. Gaya, A., A. Esteve, J. Casabona, J. J. McCarthy, J. Martorell, T. F. Schulz, and D. Whitby. 2004. Amino acid residue at position 13 in HLA-DR beta chain plays a critical role in the development of Kaposi's sarcoma in AIDS patients. *AIDS* 18:199-204.
48. Smith, N. A., C. A. Sabin, R. Gopal, D. Bourbouli, W. Labbet, C. Boshoff, D. Barlow, B. Band, B. S. Peters, A. de Ruiter, D. W. G. Brown, R. A. Weiss, J. M. Best, and D. Whitby. 1999. Serologic evidence of human herpesvirus 8 transmission by homosexual but not heterosexual sex. *J Infect Dis* 180:600-606.
49. Grulich, A. E., J. M. Kaldor, O. Hendry, K. Luo, N. J. Bodsworth, and D. A. Cooper. 1997. Risk of Kaposi's sarcoma and oroanal sexual contact. *Am J Epidemiol* 145:673-679.
50. Diamond, C., H. Thiede, T. Perdue, D. MacKellar, L. A. Valleroy, and L. Corey. 2001. Seroepidemiology of human herpesvirus 8 among young men who have sex with men. *Sex Transm. Dis.* 28:176-183.
51. Grulich, A. E., S. J. Olsen, K. Luo, O. Hendry, P. Cunningham, D. A. Cooper, S.-J. Gao, Y. Chang, P. S. Moore, and J. M. Kaldor. 1999. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a sexually transmissible infection? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20:387-393.
52. Armenian, H. K., D. R. Hoover, S. Rubb, S. Metz, R. A. Kaslow, B. R. Visscher, J. S. Chmiel, L. A. Kingsley, and A. J. Saah. 1993. Composite risk score for Kaposi's sarcoma based on a case-control and longitudinal study in Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) population. *Am J Epidemiol* 138:256-265.
53. Dukers, N. H. T. M., N. Renwick, M. Prins, R. B. Geskus, T. F. Schulz, G.-J. Weverling, R. A. Coutinho, and J. Goudsmit. 2000. Risk factors for human herpesvirus 8 seropositivity and seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am J Epidemiol* 151:213-224.
54. Goudsmit, J., N. Renwick, N. H. Dukers, R. A. Coutinho, S. Heisterkamp, M. Bakker, T. F. Schulz, M. Cornelissen, and G. J. Weverling. 2000. Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam Cohort Studies (1984-1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4838-4843.
55. Boldogh, I., P. Szaniszlo, W. A. Bresnahan, C. M. Flaitz, M. C. Nichols, and T. Albrecht. 1996. Kaposi's sarcoma herpesvirus-like DNA sequences in the saliva of individuals infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 23:406-407.
56. Blackburn, D. J., E. T. Lennette, J. Ambroziak, D. V. Mourich, and J. A. Levy. 1998. Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis* 177:213-216.
57. Mayama, S., L. E. Cuevas, J. Sheldon, O. H. Omar, D. H. Smith, P. Okong, B. Silvel, C. A. Hart, and T. F. Schulz. 1998. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-

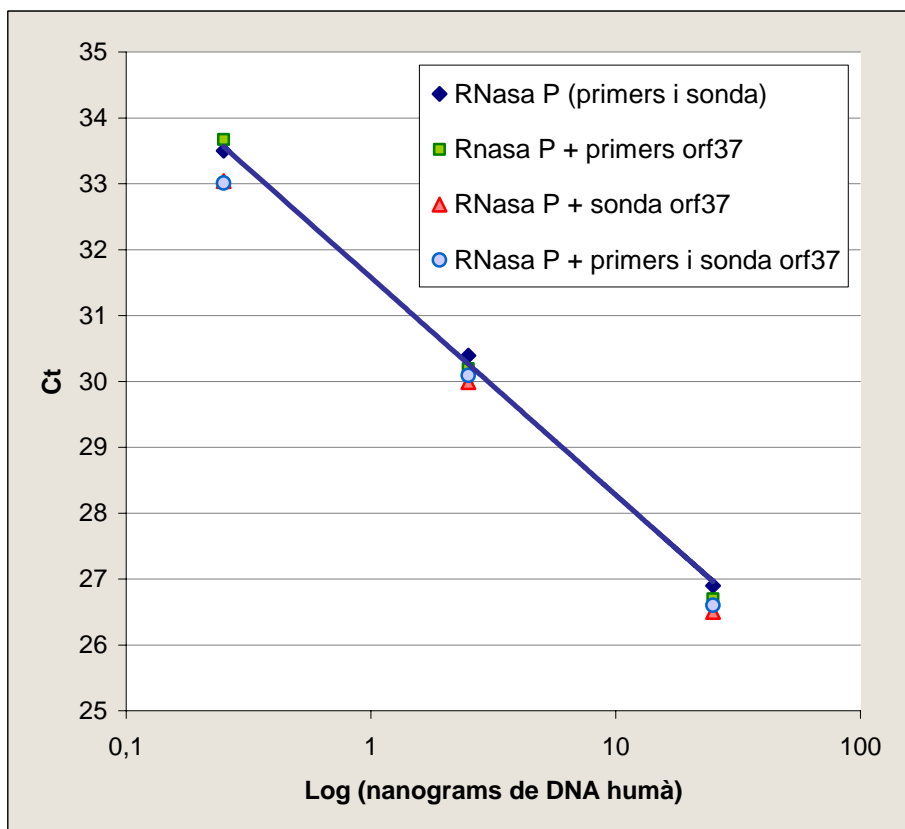
- associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int. J. Cancer* 77:817-820.
58. Lefrère, J. J., M. C. Meyohas, M. Mariotti, J. L. Meynard, M. Thauvin, and J. Frottier. 1996. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences before the appearance of Kaposi's sarcoma in human immunodeficiency virus (HIV) - positive subjects with a known date of HIV seroconversion. *J Infect Dis* 174:283-287.
 59. Verbeek, W., M. Frankel, S. A. Miles, J. W. Said, and H. P. Koeffler. 1998. Seroprevalence of HHV8 antibodies in HIV-positive homosexual men without Kaposi's sarcoma and their clinical follow-up. *Am J Clin Pathol* 109:778-783.
 60. Gill, J., D. Bourboulia, J. Wilkinson, P. Hayes, A. Cope, A. G. Marcelin, V. Calvez, F. Gotch, C. Boshoff, and B. Gazzard. 2002. Prospective study of the effects of antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection in patients with and without Kaposi sarcoma. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 31:384-390.
 61. Bourboulia, D., D. Aldam, D. Lagos, E. Allen, I. Williams, D. Cornforth, A. Copas, and C. Boshoff. 2004. Short- and long-term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune responses and viraemia. *AIDS* 18:485-493.
 62. Moore, P. S. and Y. Chang. 1995. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 332:1181-1185.
 63. Rabkin, C. S., T. F. Schulz, D. Whitby, E. T. Lennette, L. I. Magpantay, L. Chatlynne, R. J. Biggar, and Interlaboratory Collaborative Group (United States). 1998. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis* 178:304-309.
 64. Simpson, G. R., T. F. Schulz, D. Whitby, P. M. Cook, C. H. Boshoff, L. Rainbow, M. R. Howard, S.-J. Gao, R. A. Bohenzky, P. Simmonds, C. A. Lee, A. de Ruiter, A. Hatzakis, R. S. Tedder, I. V. D. Weller, R. A. Weiss, and P. S. Moore. 1996. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 348:1133-1138.
 65. Gao, S.-J., L. A. Kingsley, D. R. Hoover, T. J. Spira, C. R. Rinaldo, A. J. Saah, J. P. Phair, R. Detels, P. Parry, Y. Chang, and P. S. Moore. 1996. 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.

8. ANNEX 2

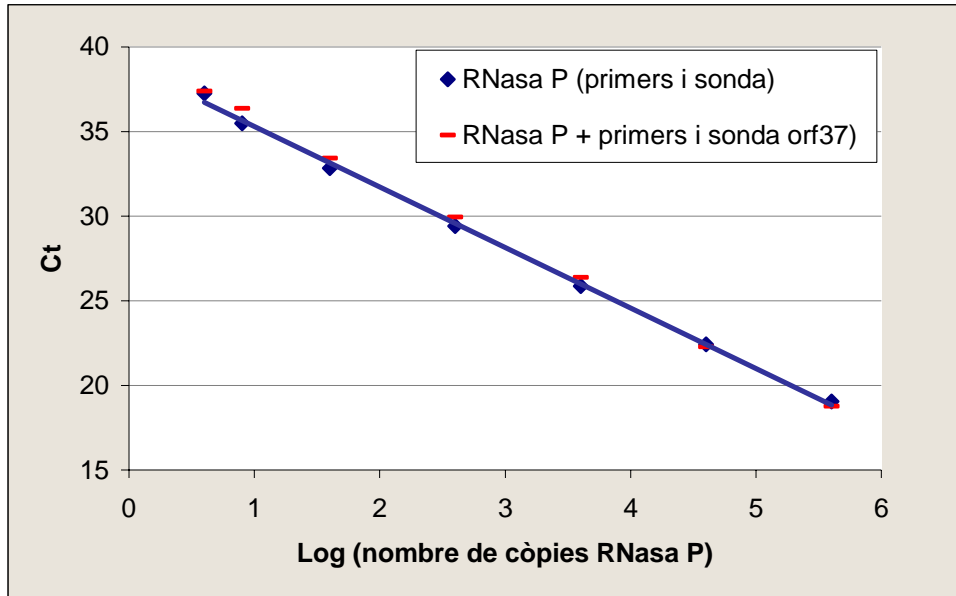
Optimització de la reacció de PCR quantitativa dúplex en temps real

1. Comprovació de l'absència d'interaccions entre els dos parells de *primers* i sondes.

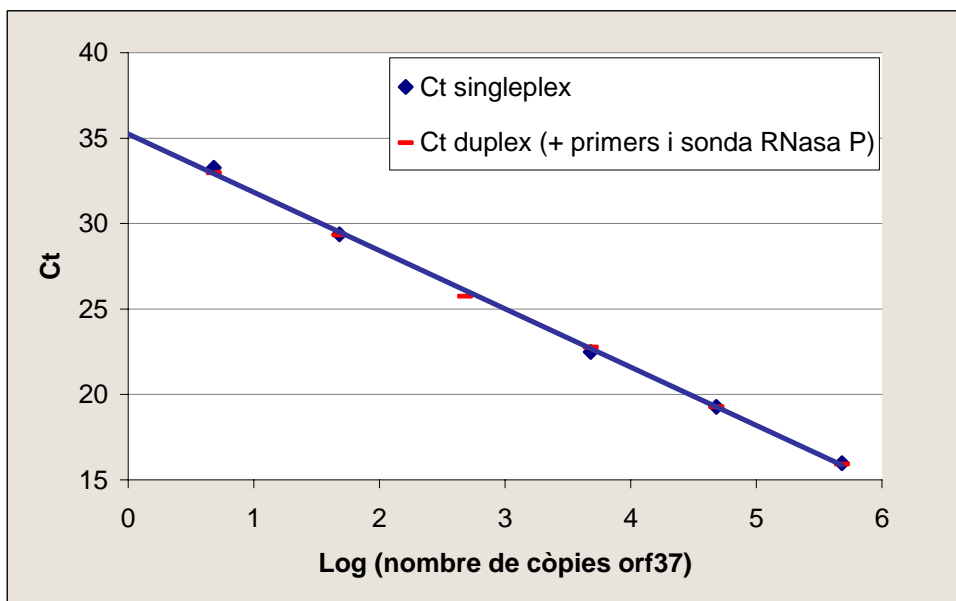
1.1. Comprovació de la amplificació de la RNasa P en presència dels *primers* i/o la sonda específics per l'*orf37* de l'HVH-8.



- 1.2. Confirmació de la correcta amplificació de la RNasa P en presència dels *primers* i la sonda específics per l'*orf37* de l'HVH-8, utilitzant la corba estàndard completa de DNA humà per a la quantificació de la RNasa P.

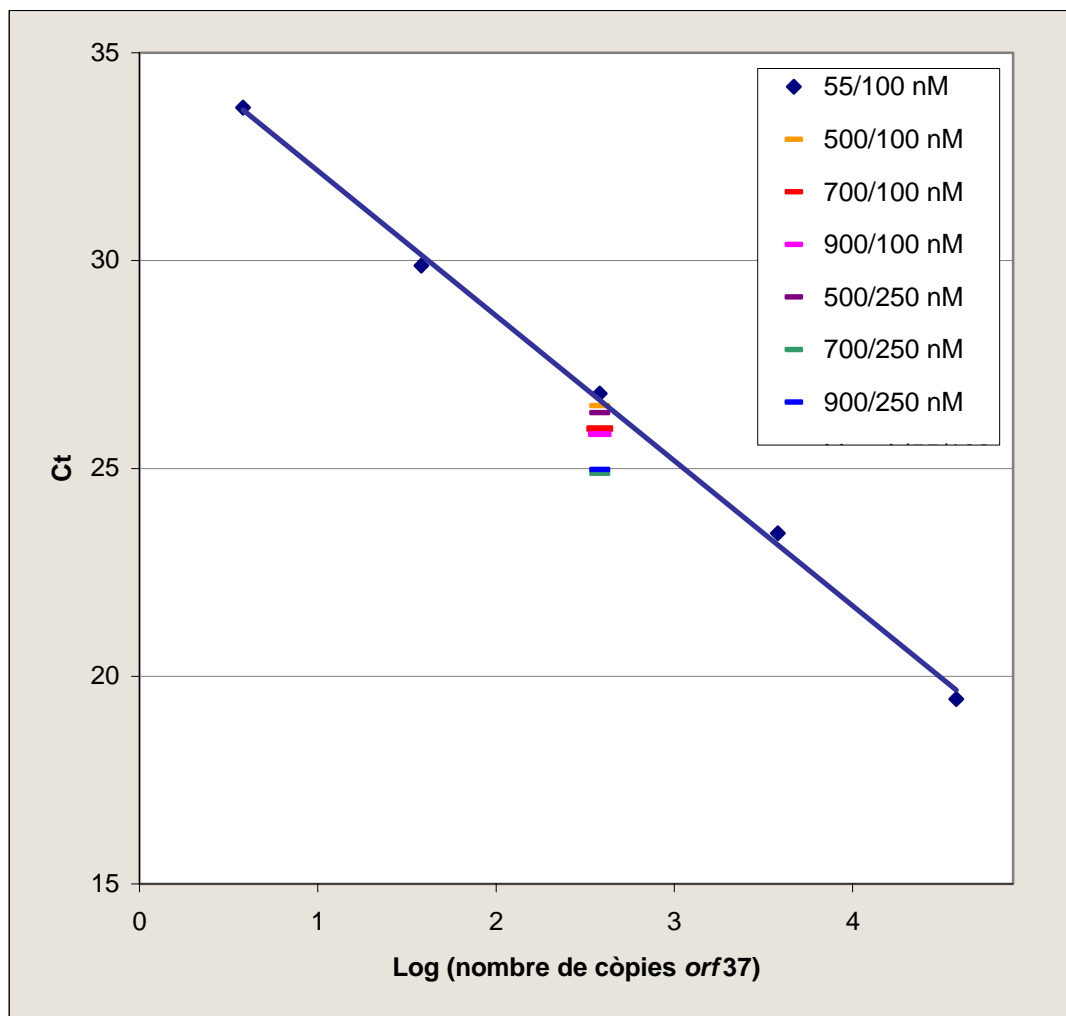


- 1.3. Confirmació de la correcta amplificació de l'*orf37* de l'HVH-8 en presència dels *primers* i la sonda específics per la RNasa P, utilitzant la corba estàndard amb el plàsmid *orf37*-pPICZ α A.



2. Optimització de les concentracions de *primers*/sondes per a la correcta coamplificació de les dues dianes.

2.1. *Primers*/sonda per a l'*orf37* HVH-8: augmentades fins a 900/250 nM. Cal modificar les concentracions en un punt que estigui al mig de la corba estàndard, on la quantificació de petits canvis és més acurada.



2.2. Disminució de la concentració de *primers* per a la RNasa P humana.

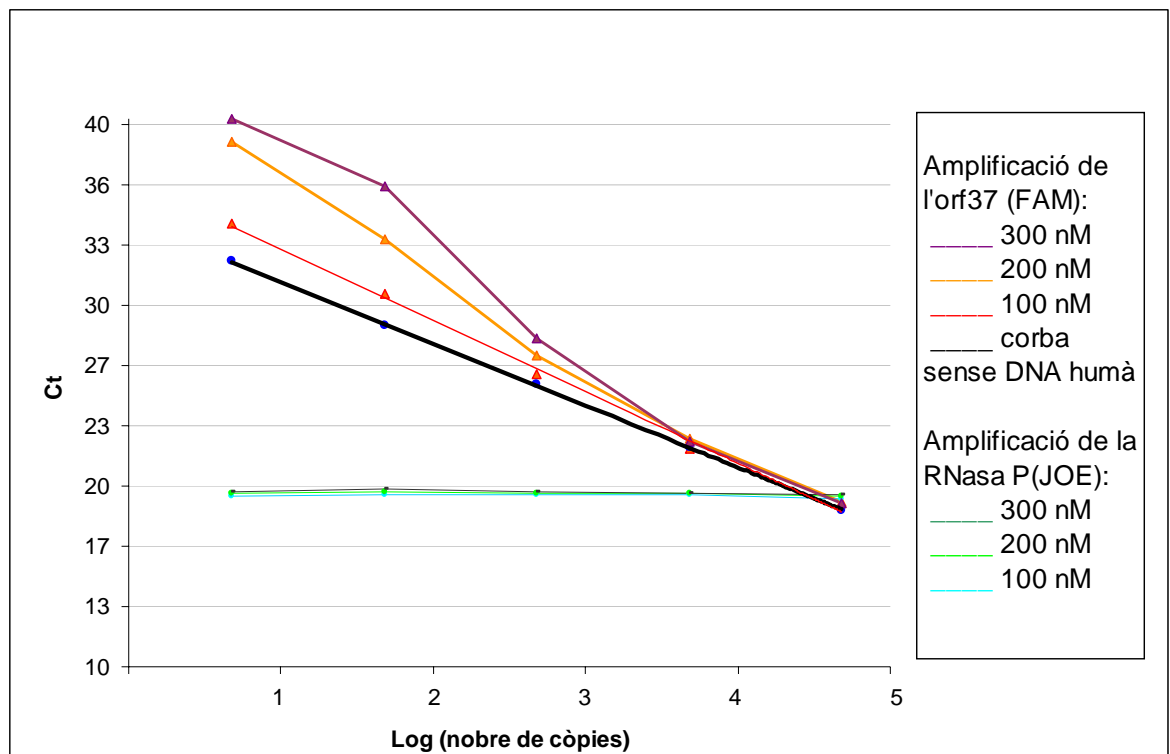
Com es pot veure, la disminució de la concentració va tenir un efecte insignificant sobre els Ct dels estàndards.

Corba estàndard de la RNasa P (nombre de còpies)	Concentració de primers per la RNasa P			
	300 nM	100 nM	75 nM	50 nM
10	37,00	37,19	37,22	36,81
40	34,14	34,87	34,39	34,83
400	30,85	31,07	30,71	31,04
4.000	27,23	27,27	27,27	27,42
40.000	23,55	23,62	23,53	23,60
400.000	20,20	19,96	19,92	20,21

2.3. Comprovació de l'eficiència de coamplificació de les dues dianes:

corba estàndard per l'*orf37* en presència de 1.3 µg de DNA humà.

Com es pot observar, en disminuir la concentració dels primers de la RNasa P de 300 nM a 100 nM augmenta l'eficiència de l'amplificació de l'*orf37* (disminueix el Ct), mentre no es modifica l'eficàcia de l'amplificació de la RNasa P. Per tant s'escull la concentració de *primers* per a la RNasa P de 100 nM.



9. ANNEX 3

Estratègia per a la detecció fiable del genoma de l'HVH-8 en PBMC a partir de mostres de sang de pacients coïnfectats amb el VIH

Els càlculs estan basats en la freqüència més baixa observada entre els pacients PCR positius inclosos en l'estudi. Segons la distribució de Poisson, i atès que el nombre de genomes de l'HVH-8 per cèl·lula infectada pot arribar a ser relativament baix, és necessària la presència de 3 cèl·lules infectades, com a mínim, per poder detectar una reacció de PCR com a positiva amb una probabilitat del 95%:

$$\mu = -\ln F_0; \text{ quan } F_0 = 0.05, \mu = 3$$

- **Pacients amb SK:**

1. Extracció de sang: es requereix un tub amb anticoagulant (preferiblement EDTA o citrat) de **5 ml** (en realitat en necessitem només al voltant de 3 ml per obtenir prou PBMC).
2. Aïllament de les PBMC: per centrifugació en gradient de Ficoll

(Els passos 1 i 2 es poden canviar per l'extracció de sang directament en tubs CPT (Bekton-Dickinson) i centrifugació ordinària per a la obtenció de les PBMC).

3. Lisi cel·lular: a partir de **4×10^6 PBMC** en 100 μ l de tampó de lisi (tampó Tris-HCl pH 8.0 10mM, 0.5% de lauril éter i 100 mg/ml de proteïnasa K) – incubació 2 h a 65°C i 15 min a 95°C en un termobloc.

4. PCR: utilitzar 10 µl del lisat cel·lular en una primera reacció de PCR amb primers i sonda específics per l'*orf37* (qualitativa o quantitativa, segons convingui).
5. En el cas d'obtenir un resultat negatiu, realitzar la PCR per la resta de volum de lisat cel·lular (9 replicats de 10 µl).

- **Pacients de risc pel SK:**

Realitzar el mateix procés, però augmentant el volum de sang i de PBMC lisades.

1. Extracció de sang: **6 ml**.
2. Lisi cel·lular: **9×10^6 PBMC** en 225 µl de tampó de lisi
3. PCR: utilitzar 10 µl del lisat cel·lular en una primera reacció; en el cas d'obtenir un resultat negatiu, realitzar la PCR per la resta de volum de lisat cel·lular (21 replicats) alhora o en dos tandes (una primera amb 10 replicats i si surt negativa, una segona amb la resta).

En el cas d'utilitzar una reacció de PCR quantitativa obtindríem valors de càrrega viral útils en el seguiment de la malaltia i/o tractament en el cas dels pacients coinfectats amb SK, o per a l'estudi del curs de la infecció en pacients a risc de desenvolupar SK. En el cas de la PCR qualitativa, la proporció de replicats positius respecte el total (10 per als pacients amb SK i 22 per als pacients de risc) també podria ser útil per a aquesta finalitat.

En el cas d'obtenir resultats negatius, tot i haver realitzat la PCR en tots els replicats, si es desitgés continuar estudiant la possibilitat de virèmia, es podria augmentar el volum de sang i el nombre de PBMC lisades, sempre mantenint la mateixa proporció de cèl·lules per volum de tampó de lisi.



Nov 23, 2004

Centers for Disease Control
and Prevention

Doctorate Commission
Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, Spain

To whom it may concern,

It is with great enthusiasm that I write a letter of reference for Elisa Martro. Ms. Martro was a graduate student in the Herpesvirus Section from Feb 2001 to Feb 2003 and worked in my lab under my supervision during her first year. In addition, I was a member of her thesis committee, comprised of 5 scientists that met every 3-4 months for the duration of her stay. In all aspects of her work, Ms. Martro did an outstanding job and was very productive in a relatively short period of time.

Her first project was an epidemiologic evaluation of several hundred sera from 3 countries for antibodies to HHV-8. Conceptually it was a straightforward project, but technically there was a good deal of background work involved. My lab makes all of the ELISA plates and immunofluorescence slides used for HHV-8 serology with stringent quality control standards, which Ms. Martro learned. At the time she was in my lab we received a new HHV-8 peptide for the ELISA, which I ask her to evaluate. She performed all tasks in my lab with extreme care and precision.

Her second project was basic science working with Philip Pellett studying HHV-8 viral loads in a natural infection. For this project Ms. Martro mastered several methodologies including FACS sorting, limiting dilutions assays, and quantitative HHV-8 PCR. She developed a duplex PCR reaction, and methods that quantitate cells in clinical specimens that my lab still uses. Ms. Martro is clearly very intelligent, evidenced by how quickly she learned the theory and application of complex procedures.

What is most notable about her work here is how well she did under challenging circumstances. The CDC funded a second year for her, during which Dr. Pellett would be her primary supervisor. But before her second year started, Dr. Pellett began an unplanned medical leave that would last 6 months, and leave him with much reduced availability when he returned. To review her work, her committee held meetings approximately quarterly, and she had good availability to supplies and equipment at the CDC. However, none of the other senior scientists had the expertise or the time to be mentor to Ms. Martro in Dr. Pellett's absence and she completed the viral load project largely on her own. While she was at the CDC, there were no post-doctoral fellows or other graduate students in the Herpesvirus Section for her to interact with. I know there were many times she felt intellectually and emotionally isolated, but she persevered and did an excellent job.

Personally, Ms. Martro was always very pleasant to work with. She showed remarkable persistence and determination in getting what she needed from people to complete her work, without ever being rude or disrespectful. Her communication skills are excellent demonstrated in 4 or 5 committee meetings where her presentations were consistently very organized and thoughtful. Her work produced 2 publications that she fully participated in writing. In summary, I feel Elisa Martro has all the necessary skills for a highly successful career in biomedical research.

Sincerely yours,

Sheila Dollard, PhD
Lab Director for Clinical Diagnostics
Herpesvirus/Measlesvirus Section



Philip E. Pellett, Ph.D.

Staff

Department of Virology / NN10

Office: 216/445-8411

Fax: 216/444-2998

E-mail: pelletp@ccl.org

September 14, 2004

Doctorate Commission
Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra
Spain

To whom this may concern,

This letter is to convey my high personal and professional regard for Elisa Martró Catalá, who is a doctoral candidate at your institution.

By way of introduction, my entire professional career has been in the area of herpesvirology. I earned my Ph.D. in Virology at the University of Chicago in 1986. Earlier last year I joined the Cleveland Clinic Foundation as Director of Herpesvirus Translational and Basic Research, and I am a Professor in the Department of Molecular Medicine in the newly formed Cleveland Clinic Lerner College of Medicine at Case Western Reserve University. I have secondary appointments in the Departments of Infectious Diseases at the Cleveland Clinic, in Molecular Biology and Microbiology at Case, and am a member of the graduate faculty in the joint doctoral program between Kent State University and Lerner Research Institute. Prior to joining Cleveland Clinic, I was Chief of the Herpesvirus Section at the Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta for 17 years. While at CDC, I was an active member of the graduate faculties of Emory and Georgia State Universities. One of Elisa's papers is my 100th scientific publication. I am a regular reviewer for essentially every journal that publishes on virology and infectious diseases, and am a member of the *Virology* Editorial Board. I have been invited to provide chapters on various herpesviruses for the leading texts and reference books in the areas of virology and clinical microbiology. In the past few months, I have served as an ad hoc reviewer for two NIH Virology Study Sections. I have quite a bit of experience at evaluating individuals and programs, and have closely followed the development of many young scientists.

My association with Elisa began with an inquiry from her about the possibility of joining my laboratory at CDC for a year, with support from funding she obtained from the Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). We were happy to have her join us. At some point not so long after her arrival at CDC early in 2001, we determined that the project we wanted to embark on would take more than a year, and that it would be suitable as the core of a dissertation. Because of Elisa's obvious talent and productivity, we were able to justify funding her second year from our programmatic budget. Importantly, the focus shifted from a small project to a dissertation-worthy scientific problem.

Elisa was an outstanding student. It is hard for experienced postdoctoral fellows to bring new projects to fruition in just two years. In two years, Elisa did a significant amount of high quality work that resulted in two publications, one of them being particularly outstanding (Martro et al., *Journal of Virology*, in press). *Journal of Virology* is the leading journal in the field of virology. Papers are rigorously reviewed, and the journal is widely read and cited. The project involved assessment of the number of viral genomes

in each cell that harbors human herpesvirus 8 (HHV-8), the virus that causes Kaposi's sarcoma. This is not as simple as might be expected, because (i) the virus-infected cells come in two distinct forms (latently and lytically infected, which have different virus loads), and (ii) even in immunocompromised individuals, the virus can be present in fewer than one per million circulating lymphocytes. The work involved devising systems for independently measuring the net virus genome load in a given number of cells, as well as determining the proportion of infected cells in population. Elisa took very general advice on how to proceed with such a project and with very high independence, developed a technically challenging and robust system that fully met her experimental aims and provided some biologically interesting and valuable results.

Two particularly important observations emerged from this work. First, in prior studies from many laboratories, lymphocytes from seropositive individuals have only intermittently been positive for HHV-8 DNA. Elisa showed that this is likely to be a consequence of generally low frequencies of infected cells and net viral DNA levels, so that the amounts of material routinely sampled in standard PCR reactions simply cannot be expected to reliably harbor viral DNA. Second, evidence was obtained that HHV-8 latency is regulated differently in lymphocytes *in vivo* than in lymphoma cells transformed by HHV-8. This will provide the basis for a new line of inquiry into the mechanisms of HHV-8 latency.

In addition to its forthcoming publication, the study of HHV-8 load in infected cells was presented as a poster at the International Herpesvirus Workshop in 2003, and I have been very happy to include description and discussion of the work in invited seminars and symposia talks, including at the International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections (Sicily, 2003), National Cancer Institute Mini-Symposium on Gammaherpesviruses (2003), a symposium honoring Professor Bernard Roizman of the University of Chicago on the event of his 75th birthday (2004), and the annual University of Pennsylvania Herpesvirus Symposium (2004).

Elisa has attributes that point toward high-level long-term success in science. She is very intelligent, hard working, persistent, and focused. She learned the relevant literature in a fast-moving field in a short time. She is able and willing to ask hard questions and has the confidence and rigor of thought to make a data-based case in support of her opinions and ideas. She enlisted cooperative and collaborative assistance from individuals from our and other laboratories with little or no intervention by me. A large portion of the labor in preparing her papers was by her. Importantly, Elisa provided very well-informed, thoughtful, and responsive replies to the reviews of her *Journal of Virology* paper.

I have been fortunate to have worked with a number of excellent students and fellows. Elisa is in the small group of individuals who have the set of diverse talents and skills needed to succeed as independent scientists and teachers. I have a very high expectation on the level of her future success, and will do my best to support her efforts.

Best wishes and sincerely yours,



Philip E. Pellett, Ph.D.

Director, Herpesvirus Translational and Basic Research

Professor, Department of Molecular Medicine

Cleveland Clinic Lerner College of Medicine at Case Western Reserve University