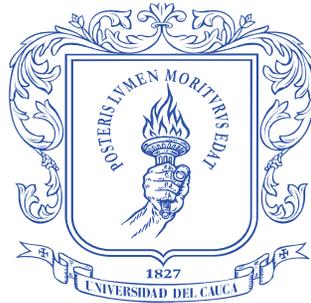


**IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL HERPES VIRUS HUMANO-6 EN PACIENTES DEL DEPARTAMENTO DEL
CAUCA**



**Universidad
del Cauca**

GLORIA INÉS ÁVILA GONZÁLEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA
POPAYÁN – CAUCA
2018**

**IMPLEMENTACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO
DEL HERPES VIRUS HUMANO-6 EN PACIENTES DEL DEPARTAMENTO DEL
CAUCA**



**Universidad
del Cauca**

GLORIA INÉS ÁVILA GONZÁLEZ

**Informe final en la modalidad investigación presentado para optar por el título
de Maestría en Biología**

DIRECTOR:

MD., M.Sc. JULIO CÉSAR KLÍNGER HERNÁNDEZ

ASESORES:

PhD. ROSA AMALIA DUEÑAS CUELLAR

PhD. VICTORIA EUGENIA NIÑO CASTAÑO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXCTAS Y DE LA EDUCACIÓN
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA
POPAYÁN – CAUCA**

2018

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de las personas que formaron parte de este proyecto del Grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas, quiero expresar mis sinceros agradecimientos por la asesoría, paciencia, compañerismo y dedicación. Ellos son: Dr. Julio Cesar Klínger, Dra. Rosa Amalia Dueñas, Dra. Victoria Eugenia Niño, Dra. Diana Mora, Dr. Diego Illera, Dra. Lorena Mendoza, Sra. Mirtha Olave. Los estudiantes del SYEi: Fernando Sánchez Muñoz, Andrés Felipe Erazo, Rigobert Alexis Riascos y Cristian Alberto Anacona.

A la Universidad del Cauca y Vicerrectoría de Investigaciones por la beca para cursar esta maestría y por la financiación del proyecto. A todos los docentes de la Maestría en Biología por sus enseñanzas.

A mi familia y amigos por su constante paciencia, apoyo y preocupación: Isabella Fernández Ávila, Olga Nelly González y Jeanneth Chantre.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.2. IMPACTO.....	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GENERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MARCO TEORICO	15
3.1. DESCRIPCIÓN DEL HERPES VIRUS HUMANO TIPO 6 (HVH-6).....	15
3.2. EPIDEMIOLOGÍA	19
3.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	20
3.4. ASOCIACIÓN DEL HVH-6 CON ALTERACIONES DEL SNC.....	21
3.5. ASOCIACIÓN DEL HVH -6 CON FATIGA CRÓNICA	22
3.6. ASOCIACIÓN DEL HVH-6 CON ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS	23
3.7. OTRAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS A HVH-6.....	25
3.8. TRATAMIENTOS PARA LA INFECCIÓN POR HVH-6.....	25
3.9. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	26
3.9.1. Ensayos de qPCR para ADN de HVH-6.....	28
3.9.2. ELISA para HVH-6	29
3.9.3. Test de Tzanck para HVH-6	30
4. ANTECEDENTES	31
5. METODOLOGÍA	34
5.1. DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
5.2. CÁLCULO DE MUESTRA.....	35
5.3. DESCRIPCIÓN DE PARTICIPANTES Y TOMA DE MUESTRA.....	36
5.3.1. Criterios de inclusión.....	36
5.3.2. Criterios de exclusión.....	36
5.3.3. Captación de los pacientes y toma de muestras.....	37

5.4.	TÉCNICAS MOLECULARES Y DIAGNÓSTICAS PARA DETECCIÓN DE HVH-6.....	38
5.4.1.	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para detección de ADN de HVH-6.....	38
5.4.1.1.	Extracción de ADN con kit DNeasy Blood and Tissue	39
5.4.1.2.	Amplificación de ADN con CMV, HVH-6,7,8 R-gene™	40
5.4.2.	Ensayo inmunoenzimático IgG para HVH-6.....	42
5.4.3.	Test de Tzanck.....	43
5.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	43
5.6.	CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES	44
6.	RESULTADOS.....	45
6.1.	DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN.....	45
6.2.	VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE qPCR PARA HVH-6.....	47
6.3.	RESULTADOS DE qPCR	51
6.3.1.	Resultados qPCR para ADN de HVH-6.....	51
6.3.2.	Resultados qPCR para ADN de HVH-5/CMV.....	52
6.3.3.	Resultados qPCR para ADN de HVH-7.....	52
6.4.	RESULTADOS DE ELISA IgG PARA HVH-6.....	53
6.5.	RESULTADOS DEL TEST DE TZANCK.....	54
6.6.	CLASIFICACIÓN DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HVH-6.....	55
6.7.	PRESENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HVH-6.....	55
6.8.	ASOCIACIÓN DE VARIABLES DE LABORATORIO Y DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS	57
7.	DISCUSIÓN	59
8.	CONCLUSIONES	63
9.	RECOMENDACIONES	64
10.	BIBLIOGRAFÍA	65
11.	ANEXOS	75
	Anexo 1. Consentimientos informados.....	75
	Anexo 2. Formato de Encuestas.....	79
	Anexo 3. Aval comité de Ética.....	81
	Anexo 4. Carta participación y cofinanciación entidad aliada.....	82

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Revisión de procedimientos diagnósticos para HVH-6	27
TABLA 2. Antecedentes de qPCR para detección de HVH-6.....	32
TABLA 3. Protocolo de montaje de qPCR	40
TABLA 4. Descripción de datos Sociodemográficos.....	46
TABLA 5. Presencia de manifestaciones Clínicas.....	56
TABLA 6. Asociación de pruebas de laboratorio/ manifestaciones clínicas.....	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Filogenia de los Herpes Virus Humanos	16
FIGURA 2. Esquema del genoma de HVH-6.....	17
FIGURA 3. Lesiones dermatológicas.....	24
FIGURA 4. Sistema de Almacenamiento de muestras	38
FIGURA 5. Sistema de cuantificación qPCR	41
FIGURA 6. Datos experimentales de qPCR para HVH-5.....	48
FIGURA 7. Datos experimentales de qPCR para HVH-6.....	49
FIGURA 8. Curvas de calibración	50
FIGURA 9. Resultados de qPCR para HVH-6/5/7.....	51
FIGURA 10. Resultados qPCR para ADN de HVH-6.....	52
FIGURA 11. Resultados de IgG para HVH-6	53
FIGURA 12. Test de Tzanck.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

1. **HVH-6:** Herpes virus humano tipo-6
2. **icHVH-6:** Herpes virus humano-6 integrado cromosómicamente
3. **VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana
4. **HVH-5 ó CMV:** Citomegalovirus
5. **HVH-7:** Herpes virus humano tipo-7
6. **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
7. **PCR-RT:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa reversa
8. **IgG:** Inmunoglobulina G
9. **ELISA:** Inmunoensayo enzimático
10. **TT:** Test de Tzanck
11. **IF:** Inmunofluorescencia
12. **VLBH:** Virus linfotrópico de células B humanas
13. **SNC:** Sistema nervioso central
14. **EM:** Esclerosis múltiple
15. **TCM:** Trasplante de células madre
16. **TMO:** Trasplante de médula ósea
17. **VPH:** Virus de Papiloma Humano
18. **LCR:** Líquido cefalorraquídeo
19. **CT:** Señal detectable
20. **UI/ml:** Unidades Internacionales por mililitro

RESUMEN

El Herpesvirus humano-6 (HVH-6) es un *Betaherpesvirus* aislado por primera vez en 1986 de pacientes VIH+, inmunodeprimidos y con trastornos linfoproliferativos. Se adquiere en edad temprana de la vida, generalmente antes de los 3 años, presentando seroprevalencia >95% en población adulta. Después de primoinfección se caracteriza por su latencia y se puede reactivar generando diferentes patologías. Las manifestaciones clínicas varían durante la primoinfección, reactivación o a las condiciones de inmunosupresión del paciente. Clínicamente, se asocia con manifestaciones neurológicas, dermatológicas y fatiga crónica, sobre las cuales no existen datos para el Departamento del Cauca. Este estudio evaluó la implementación de técnicas moleculares para diagnóstico (**qPCR**) de **HVH-6** y otros métodos diagnósticos convencionales. Los resultados fueron analizados en conjunto con los hallazgos clínicos. Se incluyeron 48 participantes (30 Sospechosos y 18 No Sospechosos de HVH-6), 17 hombres y 31 mujeres con edad promedio 45 años (18-79), a quienes se les realizó qPCR para ADN de HVH-6, ELISA IgG específica para HVH-6 y Test de Tzanck con una positividad del 17%, 85% y 23% respectivamente. Las manifestaciones clínicas en los pacientes sospechosos de HVH-6 fueron clasificadas como: Generales (83%), con compromiso Neurológico (99%), de Fatiga Crónica (93%) y Dermatológicas (86%), datos generados por primera vez en el Departamento del Cauca. Si bien se observó una baja carga viral mediante la técnica molecular de qPCR, esta representa una herramienta diagnóstica que complementa y agrega especificidad a las técnicas convencionales de ELISA y Test de Tzanck para la identificación y detección de HVH-6.

PALABRAS CLAVE. HVH-6, qPCR, ELISA.

ABSTRACT

Human Herpesvirus-6 (HVH-6) is a *Betaherpessvirus* first isolated in 1986 from HIV + patients, immunosuppressed and with lymphoproliferative disorders. Acquired early in life, usually before 3 years, presenting seroprevalence > 95% in the adult population. After primoinfection is characterized by its latency and can be reactivated generating different pathologies. Its clinical manifestations vary during primoinfection, reactivation or immunosuppression conditions of the patient. Clinically, it is associated with manifestations neurological, dermatological and chronic fatigue, associations on which there are no data for the Department of Cauca. This study evaluated the implementation of molecular techniques for diagnosis (qPCR) of HVH-6 and other conventional diagnostic methods. We included 48 participants (30 Suspects and 18 Non-Suspected HVH-6), 17 men and 31 women with an average age of 45 years (18-79), who underwent qPCR for HVH-6 DNA, specific IgG ELISA for HVH-6 and Tzanck test with a positivity of 17%, 85% and 23% respectively. The clinical manifestations in patients suspected of HVH-6 were classified as: General (83%), with Neurological (99%), Chronic Fatigue (93%) and Dermatological (86%), data generated for the first time in the Department of Cauca. Although a low viral load was observed using the qPCR molecular technique, it represents a diagnostic tool that complements and adds specificity to conventional ELISA and Tzanck Test techniques for the identification and detection of HVH-6.

KEYWORDS: HHV-6, qPCR, ELISA.

1. INTRODUCCIÓN

El Herpes virus humano tipo-6 (**HVH-6**) es un virus miembro de la familia *Herpesviridae* y subfamilia *Betaherpesvirinae*, fue aislado por primera vez en 1986 en pacientes inmunodeprimidos con trastornos linfoproliferativos e infectados por Virus de Inmunodeficiencia Humana (**VIH**) (Gallo, 2006). Se caracteriza por permanecer latente después de la primoinfección, lo que implica que la persona infectada es susceptible de desarrollar reactivación viral o co-reactivación con diferentes virus como el VIH, el citomegalovirus (**HVH-5 ó CMV**) y el herpes virus humano tipo-7 (**HVH-7**) después de un evento de inmunosupresión o de estrés intenso crónico o agudo (Julio C. Klinger, 2005; Tomás Pumarola Suñé, 2002). Estudios seroepidemiológicos demuestran que el HVH-6 es adquirido en edades tempranas (alrededor de los 2-3 años de edad) (Farr T J, 1990) y presenta una elevada prevalencia en la población, por lo que se estima que un porcentaje mayor al 95% de los adultos a nivel mundial se encuentran infectados por el virus (Ahmed M Ashshi, 2000; Dewhurst S, 1993; Farr T J, 1990).

Las estadísticas nacionales y departamentales respecto a la prevalencia del HVH-6 son desconocidas; no obstante, las observaciones clínicas realizadas por el Inmunólogo Julio César Klínger y su amplio conocimiento en el campo de la virología, han permitido identificar casos presuntivos de HVH-6 en el Departamento del Cauca y ciudades aledañas. La identificación de estos casos se ha basado en las examinación de manifestaciones clínicas frecuentemente causadas (Gallo, 2006) por el virus que incluye lesiones en piel, caracterizadas por la presencia de roséola o exantema súbito, que se extienden por el tronco, la cara y las extremidades, acompañadas de fiebre, cefalea e irritabilidad (Dedra Buchwald, 1992; Sumiyoshi. Y, Akashi. K, & Kikuchi. M, 1994), también se pueden encontrar alteraciones neurológicas (Dedra Buchwald, 1992; J A Hill et al., 2015) y de fatiga crónica (L., 2006; VanElzakker, 2013). La experticia del médico es fundamental para realizar el diagnóstico clínico del virus, ya que no se encuentra en los portafolios de los laboratorios clínicos de la ciudad las pruebas diagnósticas necesarias para la demostración de este agente causal específico. Esto conlleva a errores en el diagnóstico lo que a su vez repercute en la prescripción de tratamientos que suelen estar dirigidos a enfermedades neurológicas

o dermatológicas no asociadas al virus. Como resultado, el estado de salud del paciente puede empeorar, dejando graves secuelas en su sistema inmunológico, neurológico y dermatológico e incluso desencadenar la muerte (Gabriella Campadelli-Fiume, Prisco Mirandola, & Menotti, 1999).

Este fue un estudio de corte trasversal descriptivo, donde se analizó una población de personas “Sintomáticas” con diagnóstico presuntivo de infección por HVH-6 y de personas sanas sin signos ni síntomas relacionados al virus pero que debido a la alta seroprevalencia del HVH-6, pueden ser portadoras del mismo. A todos los participantes se les realizó las pruebas de diagnóstico convencionales como la detección de inmunoglobulina G (**IgG**) para detección de anticuerpos específicos anti-HVH-6, y el Test de Tzanck (**TT**) para observar cambios citopáticos inducido por virus. Adicionalmente, se les realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (**qPCR**) para detección de amplificación de ADN de HVH-6 previa estandarización y validación y se evaluó su utilidad como herramienta diagnóstica para los pacientes sospechosos de infección activa por HVH-6.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por el HVH-6 puede ser fatal en pacientes fuertemente inmunosuprimidos, o en pacientes inmunocompetentes con enfermedades asociadas al HVH-6. La diversidad de las enfermedades atribuidas a HVH-6 podría explicarse por la variación en la secuencia genómica viral que afecta el tropismo celular, la genética del huésped y el estado inmunológico del paciente (J. A. Hill, Sedlak, & Jerome, 2014). Se ha documentado la asociación del virus con el desarrollo de importantes enfermedades como: esclerosis múltiple, encefalitis, meningitis, neoplasias hematológicas, epilepsia, miocardiopatía crónica, progresión a SIDA en pacientes VIH+, disfunción hepática, hepatitis, síndromes hematológicos y fatiga crónica (al., 2010; Crawford et al., 2009; Loutfy, Fawzy, El-Wakil, & Moneer, 2010; R., 2010; Saddawi-Konefka & Crawford, 2010; Wolz, Sciallis, & Pittelkow, 2012). Estas patologías afectan a los habitantes del Cauca; sin embargo, no se han realizado

estudios de asociación con la infección por el HVH-6. Adicionalmente, no se cuenta con reportes de seroprevalencia y más aún, no se cuenta con pruebas específicas para detección y/o cuantificación de HVH-6 en laboratorios de diagnóstico clínico, obligando a la remisión de las muestras sospechosas de este virus hacia el exterior.

En la actualidad existen técnicas celulares, serológicas, citológicas y moleculares comerciales para la detección de HVH-6, incluyendo el inmunoensayo enzimático (**ELISA**) para la detección de IgM e IgG, cultivos celulares, Inmunofluorescencia (**IF**), el TT, qPCR para ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa reversa (**PCR-RT**) para mARN, (Annie Gravel, Ruth Hall-Sedlak, & Benedikt B. Kaufer, 2017; Bressollette-Bodin, 2014; Crawford et al., 2009; Marcano-Lozada M, 2006; Yuki Higashimoto, 2016). Estas técnicas de laboratorio se caracterizan por su rapidez, sensibilidad y especificidad, permitiendo detectar la presencia del virus (infección activa o latente), en diferentes tipos de muestras biológicas. No obstante, en el Departamento del Cauca aún no se han implementado, estandarizado, ni ofertado pruebas clínicas y moleculares que en combinación con la evaluación clínica y las pruebas de diagnóstico ya existentes, permitan un diagnóstico más preciso y oportuno para el HVH-6.

Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo implementar métodos de diagnóstico molecular para la detección del HVH-6 en pacientes del Departamento del Cauca”, más puntualmente la carga viral de ADN por qPCR. Este en combinación con las técnicas diagnósticas convencionales de detección de anticuerpos IgG por ELISA y Test de Tzanck, fueron evaluados como herramientas de soporte diagnóstico para la confirmación de casos sospechosos de infección activa por HVH-6, generando así la hipótesis de que existe una asociación directa entre la presencia de manifestaciones clínicas observadas en los participantes y la carga viral de ADN de HVH-6. Por lo tanto, la implementación de técnicas moleculares para la detección temprana del virus en los pacientes será de gran importancia para confirmar el diagnóstico y aplicar tratamientos más dirigidos y contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los portadores del HVH-6.

1.2. IMPACTO

Los resultados obtenidos en este proyecto sirvieron como base para la implementación de la técnica molecular de detección de ADN de HVH-6 por qPCR; la cual en conjunto con las pruebas clínicas existentes (ELISA y TT), complementan el diagnóstico de HVH-6. Los datos obtenidos también permitieron una aproximación sobre las cifras de seroprevalencia de la infección por HVH-6, información con la que no se cuenta en el Departamento del Cauca.

Es importante resaltar que este proyecto contribuyó con la implementación de la tecnología de qPCR en el laboratorio de Inmunología, metodología que queda al servicio de la comunidad en general para el diagnóstico de HVH-6 y que puede ser usada para el diagnóstico de otros microorganismos causantes de patologías prevalentes en esta región o que sean de interés para la comunidad científica.

Complementariamente, este estudio permitió identificar y clasificar las manifestaciones clínicas más relevantes asociadas al diagnóstico de HVH-6 en esta región del suroccidente Colombiano, las cuales permitirán al cuerpo médico realizar un diagnóstico clínico más preciso y oportuno, lo que a su vez se traduce en tratamientos más específicos y eficaces.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar métodos de diagnóstico molecular para la detección del virus del Herpes humano tipo-6 en pacientes del Departamento del Cauca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Diagnosticar la presencia del virus del Herpes humano tipo 6 en personas Sintomáticas y No Sintomáticas del Departamento de Cauca.

2.2.2. Identificar las posibles asociaciones entre características clínicas y diagnósticas en pacientes con sospecha de enfermedad por el virus del Herpes humano tipo-6.

3. MARCO TEORICO

3.1. DESCRIPCIÓN DEL HERPES VIRUS HUMANO TIPO-6 (HVH-6)

Estructuralmente el HVH-6, es un virus de DNA bicatenario, de simetría icosaédrica con 162 capsómeros y provisto de envoltura. Su diámetro oscila entre 160-200 nm y su genoma tiene aproximadamente 160-170 pares de kilobases. Fue descubierto por Robert Gallo y colaboradores en 1986 (H Agut, Bonnafous, & PGautheret-Dejean, 2015; Gallo, 2006), quienes lo denominaron virus linfotrópico de células B humanas (VLBH), al ser aislado de sangre periférica de pacientes infectados con el virus de Inmunodeficiencia humana VIH y que simultáneamente presentaban síndromes linfoproliferativos. En 1988, Yamanishi *et al.*, demostraron que la primoinfección por el HVH-6 era la responsable del exantema súbito de la infancia o *roseola infantum*.

En el año de 1996 se le designó como β herpes virus humano tipo-6, siendo clasificado dentro del **Grup I** (dsDNA), Orden *Herpevirales*, Familia *Herperviridae*, Subfamilia *Bethaherpervirinae* y en el Género *Roseolavirus* (Schleiss, 1996). A la fecha se conocen dos cepas del virus; el HVH-6A y el HVH-6B, denominadas así en el 2012 por el International Committee on Taxonomy of Viruses (Ablashi et al., 2014; Suñé, Hernández, Maeso, & Camacho) (**Figura 1**). La variante HVH-6A se asocia a desordenes linfoproliferativos, mientras que la variante HVH-6B se asocia a roséola infantil. Estos dos serotipos comparten el 95 % de nucleótidos, con algunas diferencias estructurales y de terminales genómicas, como por ejemplo sus perfiles de restricción por endonucleasas. Estas diferencias, aunque pequeñas permiten clasificar los virus por sus características serológicas y morfológicas en dos tipos de virus diferentes denominados HVH6A Y HVH-6B. Su secuencia genómica completa se encuentra en el GenBank (Schleiss, 1996; Strausbaugh, Caserta, Mock, & Dewhurst, 2001).

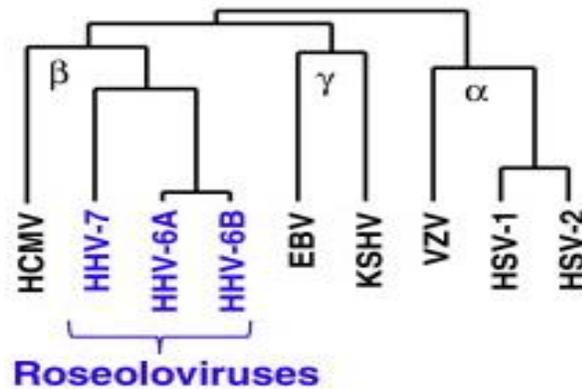


Figura 1. Filogenia de los Herpes Virus Humanos. Homología entre los β herpesvirus y el género *Roseolavirus*: HCMV, HVH-7, HVH-6A Y HVH-6B. Obtenido de: Current Opinion in Virology 2014, 9:170–177.

El HVH-6 junto con el HVH-5 y HVH-7 (**Figura 1**), también comparten una gran homología y similitud genómica, además de su tropismo por los linfocitos T CD4⁺, lo que contribuyó a clasificarlos dentro de la subfamilia *Bethaherperviridae*. Esto a su vez les confiere gran similitud serológica y morfológica, por lo que las manifestaciones clínicas especialmente las dermatológicas, neurológicas y de fatiga crónica son muy similares en estos tres herpesvirus (H Agut et al., 2015; Schleiss, 1996).

Se ha descrito el genoma del HVH-6A y HVH-6B como un segmento único (**U**) de DNA de 145 kbp, flanqueado por regiones repetitivas directas idénticas (**DR**) de 9kbp. Los DR están flanqueados por pac1 y pac2 que son secuencias que están involucradas en la división y el empaquetamiento del genoma del HVH-6 (**Figura 2**). Contiguo a pac2 está una matriz de repeticiones telemétricas (**TMR**) idénticas a las secuencias del telómero humano (TTAGGG), donde se cree es el sitio de integración del HVH-6, aunque este mecanismo aún no está bien definido (Ablashi et al., 2014; Flamand, 2014; Kaufer & Flamand, 2014; Schleiss, 1996).

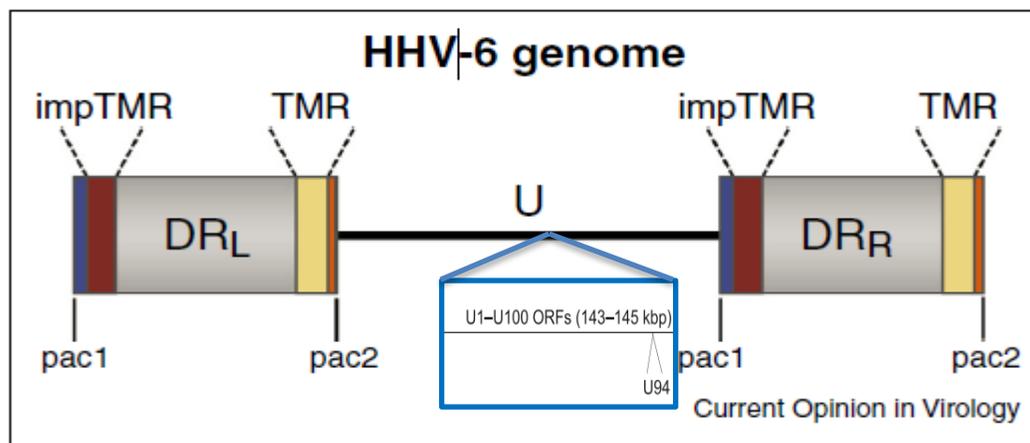


Figura 2. Esquema del genoma de HVH-6. La región única (U) del genoma HVH-6 (145 kbp) está flanqueada por dos secuencias de repetición directas idénticas (10-13 kbp) denominadas DRL y DRR. Los DR contienen secuencias pac1 y pac2, secuencias teloméricas perfectas (TMR) e imperfectas (impTMR). Modificado de: Chromosomally integrated HVH-6: impact on virus, cell and organismal biology (Flamand, 2014).

En la región U se encuentran los siete bloques principales de genes centrales (U27-U37, U38-U40, U41-U46, U48-U53, U56-U57, U66EX2-U77 y U81-U82), comunes en los miembros de la familia de los herpesvirus (Pritchett & Ablashi, 2014). Estos genes son conservados y codifican las proteínas que participan en la replicación, ensamble y empaquetamiento del genoma viral en un virión maduro y codifican una serie de proteínas inmunomoduladoras con diversas funciones. El segmento U posee además un bloque de genes (U2-U19) que se conservan entre HVH-6, HVH-7 y CMV (Arbuckle, 2011; Dharam A, 2014; Geraldin A Dominguez, 1999). Se han identificado

varias glicoproteínas de HVH-6, incluyendo homólogos de gB, gH y gL que participan en la entrada del virus a la célula hospedera y estarían implicadas en un posterior paso del virus de una célula infectada a otra (Schleiss, 1996), y también se han identificado anticuerpos monoclonal neutralizantes contra estas proteínas. Aunque en la actualidad se desconoce la función de muchos de los genes asociados a HVH-6, aquellos bien estudiados han permitido desarrollar diferentes técnicas para la identificación del virus y su posterior diagnóstico de laboratorio (H Agut et al., 2015; Bressollette-Bodin, 2014; Krug & Pellett, 2014; Richard Stanton, 2002).

El HVH-6, es el único virus de la familia *herpesviridae* capaz de integrarse a nivel de los telómeros en las regiones repetitivas terminales de cualquiera de los cromosomas humanos. En consecuencia, la adición resultante de más de 150 kb del genoma del virus al ADN de la célula hospedera, resulta en una forma endógena "heredada" conocida como herpes virus humano-6 integrado cromosómicamente (**icHVH-6**). Este es el mecanismo mediante el cual el HVH-6 puede transmitirse a la progenie a través de la línea germinal, produciendo una infección congénita que se estimada ocurre en el 1-2% de la población mundial (Adam J. Bell, 2014; Breese C., 2008; Flamand, 2014; J. A. Hill et al., 2016; Louis, 2014; Tweedy et al., 2016).

HVH-6 tiene alta afinidad por los linfocitos T CD4+, pero puede infectar toda clase de células como las natural killer (NK), monocitos-macrófagos, células dendríticas, astrocitos, oligodendrocitos, gametos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (Gabriella Campadelli-Fiume et al., 1999; Geraldin A Dominguez, 1999). Las glándulas salivales son el principal sitio para el establecimiento de la infección crónica viral, esto se demuestra por la frecuente detección mediante la técnica de PCR del HVH-6 en saliva de personas infectadas crónicamente, considerándose que el principal medio de transmisión de este virus es la vía oral. En general, el ADN de HVH-6 se puede detectar mediante pruebas moleculares en cualquier tipo de células y tejidos infectados incluyendo cerebro, piel, bazo, pulmón, corazón, riñón, glándulas adrenales, esófago, duodeno, colon, hígado y células progenitoras de médula ósea (Takemoto, Mori, Ueda, Kondo, & Yamanishi, 2004). En las muestras de biopsia o necropsia puede demostrarse la presencia del HVH-6 mediante la utilización de métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos

monoclonales específicos dirigidos especialmente frente a las proteínas p101, p105, p109 y p116 (H Agut et al., 2015; Dahl H 1990; Locatelli et al., 2000).

La principal célula diana del HVH-6 es el linfocito T CD4+ activado, al cual se une por intermedio de la molécula CD46 usándola como receptor de entrada (Chevallier, 2013), este receptor participa en la regulación del sistema de complemento y es importante en el proceso de reactivación del HVH-6 en pacientes post trasplante de células sanguíneas, médula ósea o sangre de cordón umbilical. Estudios *in vitro* sugieren que el HVH-6 posee propiedades inmunomoduladoras, entre las que se incluyen alteraciones en la expresión de receptores de superficie (CD3, CD46), receptores de quimioquinas (CCR7 o CXCR4) o producción de citoquinas (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15), aspectos que probablemente contribuyen de forma importante a la patogenia de la infección y en especial a su potencial inmunosupresor (Becerra, 2014; Hudson, 2014; Mayne et al., 2001).

Clínicamente, la infección por el HVH-6 puede ser fatal en pacientes fuertemente inmunosuprimidos (VIH, diabetes, enfermedades autoinmunes, cáncer o trasplantados) (Y Asano et al., 1992; Chan et al., 1997; Chen M. et al., 1994; Le Guennec et al., 2017; Ma et al., 2000; Peters & Rabkin, 2015; Soldan et al., 1997), o en pacientes inmunocompetentes con enfermedades asociadas a HVH-6 (alergia a medicamentos, hepatitis fulminante, síndrome febril, epilepsia, esclerosis múltiple, encefalitis, meningitis, neoplasias hematológicas, epilepsia, embarazadas y miocarditis) (Arribas Anta et al., 2016; Bridgette Jeanne Billioux, 2014; Dreyfus, 2016; Leibovitch & Jacobson, 2015; Leveque et al., 2011; Tesini, Epstein, & Caserta, 2014).

3.2. EPIDEMIOLOGÍA

La seroprevalencia para HVH-6 a nivel mundial es aproximadamente del 98-100% en población adulta, esto debido que las personas se exponen al virus desde edades tempranas (menores de 3 años). Por ejemplo, Strausbaugh et. al., 2001 encontró que la población pediátrica entre 6 y 9 meses ya se encuentra infectada por HVH-6, asociado con roseola infantum y enfermedades febriles no diferenciadas (Strausbaugh et al., 2001). Estudios relacionados han detectado que la infección

temprana puede ser congénita (resultado de la transmisión del icHVH-6 hasta un 2%), transplacentaria en el 86% de los casos, o postnatal en el 14% de los casos (Caroline Breese Hall & Jennifer A. Carnahan, 2008). Estos hallazgos coinciden con los descritos por Baillargeon y colaboradores (2000), quien demostró que el 100% de mujeres embarazadas y no embarazadas estudiadas estaban infectadas por el virus, estas últimas con títulos mayores de anticuerpos contra HVH-6: $>/160$ y $>/320$ UI/ml respectivamente, siendo el subtipo HVH-6A el más común (29%) (Baillargeon, Jacques Piper, Jeanna Leach, & T, 2000).

En Colombia, hasta el momento no existen reportes epidemiológicos de HVH-6. Esto probablemente debido a que no es de notificación obligatoria y que además debido a la similitud de sus características clínicas con la de otras entidades, es difícil establecer un diagnóstico diferencial para esta infección en particular.

3.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La primoinfección por el **HVH-6** ocurre prevalentemente vía oral en los dos primeros años de vida, con mayor frecuencia entre 6-9 meses de edad. En los infantes la infección inicial puede ser asintomática o presentar exantema súbito también llamado *roseola infantum*. Esta manifestación clínica es generalmente autolimitada (menos de una semana), cursa con fiebre y la aparición de un exantema máculopapuloso (Krug & Pellett, 2014). El exantema se presenta en tan sólo el 20% de los niños con infección primaria y en el 80% restante se asocia con un cuadro febril inespecífico (Laina et al., 2010). En cuanto a las complicaciones asociadas a la primoinfección por el virus, las cuales son poco reportadas en niños se encuentran: convulsiones (Kaufer & Flamand, 2014), síndrome hemofagocítico (Takagi, Unno, Maruyama, Kaneko, & Obinata, 1996) y hepatitis fulminante (Yoshizo Asano et al., 1990). En los adultos la primoinfección tardía puede cursar con una leve enfermedad febril que se asocia al síndrome mononucleósico (Akashi et al., 1993). HVH-6 puede establecerse de por vida en un estado de latencia que se caracteriza por la presencia continua del genoma viral dentro de la célula infectada, pero sin replicación activa del virus (Kaufer & Flamand, 2014). Bajo condiciones de inmunosupresión, por ejemplo en

pacientes trasplantados el virus se reactiva y acelera el rechazo del órgano lo que conduce a la muerte (Herbein et al., 1996). Adicionalmente, aunque en menor frecuencia, la infección por HVH-6 puede causar complicaciones en pacientes inmunocompetentes, incluyendo encefalitis, linfadenitis, problemas dermatológicos, cardiomiopatías y síndrome de fatiga (Buchwald et al., 1992; Maric et al., 2004; Reddy, Eliassen, Krueger, & Das, 2017; Y Sumiyoshi, 1994).

A continuación, se hará referencia de las complicaciones mayormente descritas para HVH-6.

3.4. ASOCIACIÓN DEL HVH-6 CON ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO

El HVH-6 ha sido relacionado con el desarrollo de enfermedades neurológicas que incluyen encefalitis, convulsiones, epilepsia del lóbulo temporal mesial y esclerosis múltiple. Las evidencias sobre esta relación se basan en la identificación del ADN viral en tejido cerebral obtenido de autopsias o cirugías, a la titulación de anticuerpos IgM/IgG o a estudios inmunohistoquímicos, donde los resultados muestran un aumento significativo de la presencia del virus en comparación con muestras de individuos sanos, indicando que el virus tiene tropismo marcado por células del sistema nervioso central (**SNC**) (Ahlqvist et al., 2005; Donati et al., 2005; Takahashi et al., 1989). En la esclerosis múltiple (**EM**) la presencia del HVH-6, en oligodendrocitos, linfocitos T y microglías, desempeña un papel importante en la desmielinización de las fibras nerviosas, debido a que favorece mecanismos de mimetismo molecular ocasionando el reconocimiento y degradación equívoco de la proteína básica de la mielina (Tejada-Simon, 2003); en consecuencia, se pierde la velocidad de conducción del impulso nervioso y de su respuesta, lo que se manifiesta con pérdida de las propiedades de conducción motora (Chi et al., 2012).

El HVH-6 se relaciona con convulsiones febriles al causar inflamación de las meninges, con exantema súbito y meningoencefalitis (Y Asano et al., 1992). Al realizar PCR para la detección del ADN viral en muestras de líquido cefalorraquídeo (**LCR**) de pacientes con historia clínica de convulsiones, el virus fue detectado en 9 de 10

muestras de pacientes con exantema súbito que mostraron síntomas neurológicos; en 8 de 10 muestras de LCR procedentes de pacientes que tenían tres o más convulsiones febriles, y en 1 de 7 muestras de LCR de pacientes que presentaron una sola convulsión. Estos datos sugieren que HVH-6 puede invadir el cerebro durante la fase aguda de exantema súbito y que la recurrencia de convulsiones febriles puede estar asociada con la reactivación del HVH-6 (Kondo, Nagafuji, Hata, Tomomori, & Yamanishi, 1993). Otros estudios han demostrado que pacientes epilépticos tienen entre 60-70% de positividad para HVH-6B en análisis de cortes del lóbulo temporal mesencial (Leibovitch & Jacobson, 2015; Millichap & Millichap, 2015). El HVH-6 se ha encontrado activo en varios fluidos corporales como saliva, suero, orina y linfocitos de sangre periférica de pacientes con EM. Estos datos podrían sugerir que el virus se replica activamente en este grupo de pacientes con EM; sin embargo, no está claro si esto podría reflejar una reactivación del virus latente o una primoinfección (Akhyani et al., 2000; Sola et al., 1993; Soldan et al., 1997).

Datos más recientes sugieren que aproximadamente la mitad de los pacientes sometidos a trasplante de células madre (**TCM**) hematopoyéticas o trasplante de médula ósea (**TMO**) desarrollan infección activa por HVH-6 y signos de compromiso neurológico. El virus se ha asociado con el desarrollo de encefalitis límbica después de TCM (Singh & Paterson, 2000) y se ha detectado en los astrocitos del hipocampo después de TMO (Chan et al., 1997; Fotheringham, Williams, Akhyani, & Jacobson, 2008), lo que indica que el HVH-6 tiende a tener tropismo por los astrocitos del hipocampo y que el hipocampo puede ser susceptible de reactivación viral post-trasplante (Fotheringham et al., 2008).

3.5. ASOCIACIÓN DEL HVH-6 CON FATIGA CRÓNICA

El Síndrome de Fatiga Crónica (**SFC**), ha sido descrito recientemente como una condición debilitante, caracterizada por un conjunto de desórdenes heterogéneos que incluyen síntomas neurológicos como: fatiga, fiebre, dolor de garganta, cefalea, mialgias, depresión, alteración del sueño, del estado de ánimo, la memoria y la concentración (Bansal A.S., 2012; VanElzakker, 2013). Estos síntomas se atribuyen a

una respuesta inmune post inflamatoria posterior a una infección viral, bacteriana o enfermedades autoinmunes, y están asociados con un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α , antiinflamatorias como el TGF β , y aumento en la frecuencia de células NK y LT CD8+, fenómenos que a su vez se asocian con aumento de la replicación viral. Estos hallazgos se correlacionan con la habilidad de los herpes virus para colonizar las células T CD4+ y las células nerviosas como el nervio Vago. (Bansal A.S., 2012; Crawford et al., 2009; Fernández, 2002; L., 2006; R., 2010). El HVH-6, ha sido asociado al SFC por su tropismo con estas células y participar en la cronicidad de este síndrome. Estudios previos han demostrado replicación activa del HVH-6 en el 70% de cultivos primarios de linfocitos de pacientes con SFC versus un 20% en personas sanas (Dedra Buchwald, 1992), demostrando fuerte asociación entre el HVH-6 y el síndrome de fatiga crónica (Komaroff, 2006; L., 2006).

3.6. ASOCIACIÓN DEL HVH-6 CON ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS

El virus HVH-6 ha sido asociado a diferentes enfermedades cutáneas (Wolz et al., 2012). Por ejemplo, en la roséola infantum (exantema súbito), la enfermedad se caracteriza por fiebre alta, diarrea, erupción cutánea leve a lo largo del tronco, el cuello y la cara, con pequeñas máculas o pápulas de color rosa rodeadas de halos más claros; sin embargo no todos los niños infectados desarrollan la fase eruptiva (Wolz et al., 2012; Yamanishi et al., 1988). El HVH-6 también está implicado como agente causal de la pitiriasis rosácea, evidenciada por una elevada producción de anticuerpos contra el HVH-6 en algunos pacientes con esta enfermedad, sugiriendo una infección activa por este virus. No obstante, la participación de otros agentes como HVH-7 no se descarta, pues no todos los pacientes presentan una producción de anticuerpos anti HVH-6 estable durante la infección activa (Broccolo et al., 2005; Drago, Broccolo, Ciccarese, Rebora, & Parodi, 2015; Kosuge, 2000). Los pacientes con esta patología presentan parches escamosos, con una clásica forma oval, los cuales se distribuyen inicialmente en el tronco y posteriormente se diseminan hacia las extremidades

siguiendo dermatomas (**Figura 3**), aunque el prurito es común, no siempre está presente (Drago, Broccolo, & Rebora, 2009; Wolz et al., 2012).



Figura 3. Lesiones dermatológicas. Fotos obtenidas de pacientes con lesiones tipo macular y descamativas en abdomen. Lesiones tipo paulo-vesicular y puntos Rubí en piel de cuello y pecho. Fuente: propia del autor.

Otras enfermedades dermatológicas asociadas a HVH-6 incluyen liquen plano, erupción inflamatoria variable que causa pápulas púrpuras, poligonales, hipertróficas o atróficas, lineares o anulares, vesiculares o ulcerativas, esencialmente en las superficies flexoras de las extremidades superiores (Lodi et al., 2005). Adicionalmente, suele asociarse a púrpura trombocitopenica idiopática (Ma et al., 2000; Rinaldi, 2014); púrpura fulminante que se manifiesta con fuerte hemorragia cutánea y necrosis dérmica (Wolz et al., 2012); alergia a drogas que da lugar a la formación de máculas localizadas, pápulas y pústulas que pueden progresar a eritroderma generalizado en la piel (Neuman et al., 2013) y los síndromes de Stevens-Johnson (Peppercorn et al., 2010) y Gianotti-Crosti; en este último, los pacientes presentan papo-vesículas monomorfas típicas de color rosa sobre los codos (Chuh, Chan, Chiu, Ng, & Peiris, 2002). Recientemente, el HVH-6 ha sido propuesto como co-factor en la urticaria crónica idiopática, y se acuñó el término urticaria viral crónica para describir el mecanismo por el cual, bajo las condiciones de un ambiente pro-inflamatorio

(producción de citoquinas tipo Th2), el HVH-6 podría reactivarse y desencadenar la urticaria con importantes alteraciones cutáneas (Dreyfus, 2016).

3.7. OTRAS PATOLOGIAS ASOCIADAS A HVH-6

Distintas patologías han sido asociadas al HVH-6, entre las más destacadas encontramos: la púrpura trombocitopenia idiopática en donde se ha descrito alta carga viral de HVH-6 hasta en un 41% de los pacientes (Ma et al., 2000); en mieloma y EM se han encontrado secuencias proteicas muy similares al de HVH-6, lo que sugiere reactividad cruzada por sensibilización de las células B contra antígenos en el mieloma y EM. . Un estudio publicado en 1995 por Challoner et al realizado con 86 muestras de pacientes con EM y controles, permitió la identificación un fragmento de 341 nucleótidos similares en un 99.4% al gen de unión del ADN de HVH-6, mediante secuenciación del ADN se estableció que en el 97.2% de las muestras evaluadas correspondían a HVH-6 variante B, tipo 2; demostrando así una clara asociación entre HVH-6 y EM. (Álvarez-Lafuente, García-Montojo, De Las Heras, Bartolomé, & Arroyo, 2006; Fernández, 2002; Tejada-Simon, 2003).

Otra patología asociados a HVH-6 es la reacción de hipersensibilidad por medicamentos, como carbamazepine, ceftriaxona, doxiciclina, vancomicina y trimetoprim /sulfametoxazol, en estos casos se reporta una reactivación del HVH-6 que lleva a falla orgánica y un curso prolongado de la enfermedad (Matsuda et al., 2006; Nehal Draz, 2013; Neuman et al., 2013). Adicionalmente, se ha reportado coinfección del HVH-6 con otros agentes virales como Virus de Papiloma Humano (**VPH**) que se relaciona con el aumento de la progresión del cáncer de cuello uterino por alterar la expresión de los genes del VPH en células epiteliales (Chen M. et al., 1994); coinfecciones con CMV, relatan aumento en el rechazo trasplantes, lo que causa una alta morbi-mortalidad (Jaskula et al., 2010; Nuria Tormo, Laura Cardenoso, & Juan Carlos Hernandez-Boluda, 2010; Reddy & Manna, 2005; V., 2002; Zerr DM, 2005).

3.8. TRATAMIENTOS PARA LA INFECCIÓN POR HVH-6

Actualmente, a nivel mundial, ningún medicamento ha sido aprobado exclusivamente para el tratamiento de HHV-8, siendo el tratamiento dirigido al manejo de los síntomas asociados presentes en las personas afectadas. Sin embargo, el medicamento que más se utiliza es el ganciclovir (Bounaadja, Piret, Goyette, & Boivin, 2013; Mookerjee & Vogelsang, 1997). Algunos agentes anti-CMV como cidofovir, foscarnet y el valaciclovir han sido usados vía oral, los cuales han demostrado tener efecto sobre el HHV-8 (Ljungman et al., 2008; Tokimasa et al., 2002).

Durante el tratamiento se debe vigilar el uso de otros medicamentos inmunosupresores, para evitar la reactivación de los *Roseolavirus* y complicaciones en el paciente. (Szabó, 2017). En Colombia se encuentra disponible valaciclovir en tabletas de 500 mg y 1 gr, con el inconveniente de que su costo es muy elevado y estos medicamentos no están cubiertos por los sistemas de salud públicos.

3.9. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

En la actualidad se han descrito una serie de pruebas que permiten identificar la infección por el HHV-8. Sin embargo, estas presentan limitaciones en cuanto a su interpretación debido a la elevada seroprevalencia y a la persistencia del virus en sangre y tejidos después de la primoinfección, dificultando diferenciar la infección inicial de la reactivación vírica después de un periodo de latencia o una reinfección por una nueva cepa viral (H Agut et al., 2015; Tomás Pumarola Suñé, 2002).

Los métodos para detectar la presencia del virus en diferentes tipos de muestras incluyen los cultivos celulares, detección de antígenos y/o anticuerpos (IgM en fase aguda o IgG en fase crónica o latente) (**Tabla 1**), técnicas de IF, inmunohistoquímica o ELISA; detección de ácidos nucleicos por técnicas moleculares como microarreglos y PCR, visualización del virus mediante microscopía electrónica y estudios de citología e histología (Mayne et al., 2001; Tomás Pumarola Suñé, 2002; Tweedy et al., 2016). Más recientemente se ha descrito un ensayo de antigenemia para el HHV-8 sobre células mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de IF (H Agut et al., 2015; Crawford et al., 2009; Giuseppe Locatelli, 2000; Sumiyoshi. Y et al., 1994).

Tabla 1. Revisión de procedimientos diagnósticos para HVH-6. La tabla presenta diferentes metodologías diagnósticas para la detección e identificación de HVH-6, con sus correspondientes ventajas y desventajas.

Enfoque Diagnóstico	Método	Ventajas y Utilidad	Desventajas y Limitaciones
Indirecto (Serología)	Pruebas de detección directa para IgG, IgM (IFA, EIA)* y Avidéz	Fácil recolección y almacenamiento de muestras de suero, técnicas de fácil acceso, diagnóstico de infección primaria, estudios de seroprevalencia	Falta de interpretación para el diagnóstico de reactivación, sin discriminación entre HVH-6A y HVH-6B, respuesta demorado/alterado si la inmunodeficiencia está presente, reactividad cruzada con otros <i>bethaherpesvirus</i>
	Directo	Aislamiento viral en células de cultivo	Método de referencia en virología, evidencia de virus infeccioso, investigaciones precisas de cepas de virus
	Detección de Antígenos	Utiliza equipos convencionales, evidencia la expresión del gen del virus, discriminación entre HVH-6A y HVH-6B	Necesidad de estandarización, sensibilidad limitada con reactivos actuales, dificultades de lectura en algunos casos
	PCR cualitativa de ADN viral	Alta sensibilidad y especificidad, discriminación entre HVH-6A y HVH-6B	Sin distinción entre infección activa, latencia y ciHVH-6
	PCR cuantitativa de ADN viral en tiempo real (qPCR)	Alta sensibilidad y especificidad, discriminación entre HVH-6A y HVH-6B, estudios de seguimiento longitudinal, comparación de cargas virales en sangre versus órganos	Necesidad de estandarización internacional, necesidad de umbrales específicos para infecciones activas y ciHVH-6***
	Detección de transcriptos virales por RT-PCR**	Distinción entre infecciones activas y latentes, reconocimiento de infección activa en sujetos con ciHVH-6	Sensibilidad limitada (por evaluar), necesidad de estandarización
	PCR de gotita digital (dPCR)	Método preciso para medir cantidades de ácido nucleico, identificación de ciHVH-6***	Sensibilidad limitada (por evaluar), adaptación a la diversidad de especímenes clínicos

*IFA, ensayo de inmunofluorescencia

*ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

**RT-PCR, PCR de transcriptasa inversa

***ciHVH-6, herpesvirus-6 humano cromosómicamente integrado.

La disponibilidad de las pruebas mencionadas puede estar restringida en algunos centros médicos.

Tomado de: Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. Agut et al., 2015

En general, estas técnicas celulares, histológicas, serológicas y moleculares se caracterizan por su rapidez, sensibilidad y especificidad diagnóstica. Estas pruebas permiten demostrar la presencia del HVH-6 así como la respuesta humoral contra el mismo, ayudando a diferenciar la infección activa, latente o pasada. Adicionalmente, permiten asociar la presencia del virus con alteraciones clínicas dermatológicas, neurológicas y de fatiga crónica, como resultado de la detección del virus en improntas de lesiones, biopsias de piel y sangre (H Agut et al., 2015; D., 2016; Dreyfus, 2016). Los ensayos de qPCR permiten la cuantificación de la carga viral en la primoinfección y en la reactivación del HVH-6, esta reactivación en pacientes inmunocomprometidos es frecuente, además la qPCR confiere alta sensibilidad y especificidad, permite la discriminación entre los subtipos HVH-6A y HVH-6B, realizar estudios de seguimiento longitudinal, y comparación de cargas virales en sangre versus órganos. Por tanto, la detección y cuantificación temprana, así como el inicio de la terapia antiviral son importantes para reducir posibles complicaciones (Yip et al., 2017).

Las técnicas que se mencionan a continuación son **usadas durante la ejecución de este proyecto para el diagnóstico de HVH-6.**

3.9.1. Ensayos de qPCR para amplificación de ADN de HVH-6. De las técnicas de biología molecular para diagnóstico de HVH-6 una de las más usadas a nivel de laboratorios es la PCR, ya sea en Tiempo Real (q-PCR) o su variante la Transcriptasa Reversa (RT-PCR) (Ahlqvist et al., 2005; Gautheret-Dejean & Agut, 2014; Norton RA1, 1999; YoshikawaTetsushi et al., 2003). La detección de ADN viral mediante la técnica de qPCR en muestras acelulares como el plasma o el suero es un marcador de replicación o de reactivación viral del HVH-6, reactivación que se produce principalmente en pacientes inmunosuprimidos.

En general, para efectuar el ensayo de PCR se realiza la extracción del ADN a partir de la sangre total, suero, plasma u otras muestras como tejidos y biopsias, utilizando un Kit de extracción para

ADN viral, o por métodos manuales los cuales son poco recomendados. Después de extraído el ADN, se realiza el proceso de amplificación colocando en un tubo de reacción (master mix) todo lo necesario para la síntesis del fragmento de interés (Taq polimerasa, dinucleótidos, ADN, buffer con magnesio, sales, oligonucleótidos, sondas específicas para HVH-6 marcadas con fluorocromos). Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se realizan de forma automatizada en un termociclador previamente programado. El monitoreo, análisis y cuantificación del ADN se realiza por electroforesis en geles de agarosa por PCR convencional o mediante programas especializados que permiten determinar la presencia y la cantidad de copias virales del HVH-6 presente en las muestras mediante qPCR (H Agut et al., 2015).

En la actualidad los kit comerciales para qPCR de HVH-6 amplifican secuencias de los genes U53, U57 hasta U67 por ser regiones muy conservadas en el genoma de HVH-6 (Deback C., 2008; Karlsson et al., 2012), la sensibilidad y especificidad varía entre 70% y 99% de acuerdo a la casa comercial; la sonda usada y equipos en los que se estandariza, de ahí la importancia de elegir un buen kit comercial.

La detección de niveles elevados de ADN de HVH-6 en suero o plasma se asocia con a una infección activa, además permite evaluar la monitorización del grado de replicación viral y establecer su correlación con las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento (Tomás Pumarola Suñé, 2002).

3.9.2. ELISA para HVH-6. El ensayo de ELISA anti-HVH-6 se realiza utilizando un kit comercial, el cual permite la detección de las inmunoglobulinas tipo IgG e IgM presentes en el suero del paciente, con el fin de determinar si previamente se ha expuesto el sistema inmune al HVH-6 y confirmar si la infección es activa o latente. Brevemente, el

suero es diluido y se deposita en placas de ELISA (96 pozos) cuyo fondo estará recubierto con antígeno nativo de HVH-6. Luego, se realizarán lavados con una solución buffer (Theo P. Sloots, John P. Kapeleris, Ian M. Mackay, Marissa Batham, & Devine, 1996). Si los anticuerpos anti HVH-6 están presentes en los sueros a evaluar, estos se unirán a los antígenos inmovilizados. Después se realiza la adición de anticuerpos secundarios anti-IgM y anti-IgG humanos marcados con enzimas, para la detección de las inmunoglobulinas respectivas (Fiebig et al., 2017; Gutierrez J., 1997). La reacción se revela por la activación de la enzima sobre un sustrato cromogénico que se cuantifica por densidades ópticas y los resultados son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra del paciente.

Así, el ELISA ha demostrado ser la técnica de elección para la detección de IgG e IgM para HVH-6, presentando una sensibilidad y especificidad hasta del 99.7% al ser comparado con el ensayo de IFA, con la desventaja que no diferencia HVH-6A de HVH-GB (Abnova, 2017; Theo P. Sloots et al., 1996).

3.9.3. Test de Tzanck para HVH-6. El TT es una técnica indirecta que identifica cambios citopáticos inducidos en las células por los herpesvirus como consecuencia de la replicación viral. Se realiza mediante la observación directa al microscopio con lente 40X y 100X, de diferentes muestras como sedimento urinario, líquido cefalorraquídeo, improntas de vesículas y biopsias, entre otras. Las muestras a estudio se depositan en placas portaobjeto que posteriormente son fijadas y teñidas con colorantes de Giemsa, Wright y/o Azul de toluidina. En ellas se buscan cambios citopáticos como: células gigantes multinucleadas, núcleos megaloblásticos e inclusiones intranucleares e intracitoplasmáticas (Marcano-Lozada, Urrestarazu, & Serrano, 2006). Alternativamente se pueden usar equipos y software de

medición automatizados para las correspondientes lecturas (Becerra-Artiles, Santoro, & Stern, 2018).

El TT por ser un método de diagnóstico rápido, fácil y económico, presenta una sensibilidad de aproximadamente el 60-70%, siendo de utilidad en el estudio de lesiones dermatológicas de etiología viral (Marcano-Lozada M, 2006).

4. ANTECEDENTES

La PCR con sus diferentes variantes, ha sido usada para identificar la presencia del genoma del HVH-6 en diferentes patologías o para demostrar su asociación con otros virus que causan daño al ser humano (Giuseppe Locatelli, 2000; Kaufer & Flamand, 2014; Reddy & Manna, 2005; Takemoto et al., 2004; Y Sumiyoshi, 1994). La detección, cuantificación y secuenciación de ácidos nucleicos del HVH-6 se han combinado para convertirse en el “*Gold Standard*” de los procedimientos de diagnóstico aplicados a HVH-6A y sus variantes HVH-6A y HVH-6B (H Agut et al., 2015; Gautheret-Dejean & Agut, 2014). La qPCR permite cuantificar la carga viral de HVH-6 en número menor a 10 copias/ml de ADN viral, con sensibilidad de detección hasta de 2-5 copias/ml en diferentes tipos de muestras, convirtiéndose en la técnica de elección para su identificación, validándose frente al cultivo viral e IF.

Entre los estudios realizados para cuantificación de HVH-6 por qPCR se encuentran Tavakoli y colaboradores (2007) quienes detectaron ambos subtipos HVH-6A y HVH-6B por qPCR en 1.482 muestras de LCR de pacientes con encefalitis o meningitis, encontrando positivos 26 especímenes de 24 pacientes para HVH-6B, con una sensibilidad de 5 copias de genes por reacción (rango dinámico lineal de 5 a 5×10^6) y tasa de detección de HVH-6 en esta población de 1,75%. Concluyendo que la encefalitis o meningitis en ausencia de un resultado de qPCR positivo para otros agentes infecciosos, sugiere un papel importante para HVH-6 en la patogénesis de las enfermedades del sistema nervioso central (Tavakoli et al., 2007). Otros estudios de qPCR para la identificación de HVH-6 en diferentes muestras clínicas y patologías, se encuentran resumidos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Antecedentes de qPCR para la detección de HHV-6. La tabla muestra el resumen de artículos sobre qPCR para HHV-6; autor, objetivo, tipo de muestras, cebador usado, las condiciones de la qPCR, los resultados y la conclusión final.

AUTOR	OBJETIVO	MUESTRAS	CEBADOR	CONDICIONES DE LA qPCR	RESULTADOS	CONCLUSIÓN
Locatelli et al., 2000	Desarrollar un PCR cuantitativo, altamente sensible, para la medición de ADN de HHV-6 en células derivadas de tejidos y fluidos corporales, comparado con el kit TaqMan.	ADN viral de tejidos infectados con HHV-6 de ratones SCID-hu Thy/Liv o plasma humano.	TAQ6E (59-CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG-39) y TAQ6A (59-CGCTAGGTTGAGGATGAT CGA-39), del fragmento de 133 pb del gen U67 de HHV-6	50 °C por 2 min de preamplificación, 15 min de desnaturalización a 95 °C y luego 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15s e hibridación y extensión a 58 °C por 60s.	Rango dinámico de 1-10 ⁶ copias viral/prueba. Carga viral de HHV-6A mostró que qc-PCR sobreestimó (P 5 0.0001) las mediciones del TaqMan (40%). Repetibilidad similar (CV, 4/24% y 6/31%), Reproducibilidad de TaqMan fue superior a qc-PCR.	Ventajas: tiempo requerido, costos se reducen. Cuantifica con precisión el ADN objetivo; menor manipulación menor contaminación; el formato de 96 pocillos da alto rendimiento para la evaluación a gran escala.
Victoria et al., 2005	Desarrollar conjunto de cebadores para detectar HSV-1, CMV y HHV-6 en hisopos orales mediante PCR anidada	30 voluntarios sanos de las clínicas dentales y 15 sujetos sometidos a trasplante de médula ósea.	F:50 AATAGGAGCCTTGCT GGTCAGAAC 30 R:50 CCTGGAACCCACAA AACCTAACG 30	95°C por 30s, 30 ciclos de 56°C por 45s, hibridación y extensión a 72°C por 30s	Amplificaron un fragmento de ADN de 241 pb de HSV-1. Fragmentos de ADN de 224 pb para CMV y 369 pb de HHV-6. Amplificación positiva de HSV-1 y HHV-6 se observó en 24 sujetos sanos	Demostraron que estos nuevos cebadores son capaces de identificar HSV-1, CMV y HHV-6 en hisopos orales mediante PCR anidada.
Deback et al., 2008	Evaluar el kit CMV HHV-6, 7, 8 R-geneTM (Argene, Varilhes, Francia) para cuantificación de HHV-6 y la detección cualitativa de HHV-7 y HHV-8 y el uso de diferentes plataformas de extracción y qPCR en dos centros A y B.	436 muestras de sangre total: HHV-6: η=175 HHV-7: η=100 HHV-8: η=161	HHV-6: fragmento del gen U57 HHV-7: fragmento del gen U42 HHV-8: fragmento de gen ORF 26	Las condiciones varían de acuerdo al equipo de qPCR usado, no se especifican. El Gen U38 de ADN polimerasa fue el amplificador de qPCR (H6-A), realizado en el instrumento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), utilizando la tecnología TaqMan.	El kit comercial mostró concordancia de 96% y 85% en centros A y B, correlación significativa (en A: r = 0,97 [p <0,001]; en B: r = 0,70 [p <0,001]). Sensibilidad 50 copias/ml. La prueba Bland-Altman y el monitoreo prospectivo de pacientes confirmaron la precisión de estas técnicas.	Los resultados demuestran que el nuevo kit comercial CMV HHV-6, 7, 8 R-geneTM fue una herramienta eficiente y confiable para el diagnóstico de infecciones por herpesvirus 6, 7, 8
Lou et al., 2011	Desarrollar un SSPBRT-PCR para detección y diferenciación de variantes de HHV-6 (HHV-6A y HHV-6B) en pacientes pediátricos <2 años con encefalitis	405 muestras de líquido cefalorraquídeo	NC001664 para HHV-6A y AF157706 para HHV-6B. Los Genes de la ADN polimerasa (U38) fueron seleccionados como genes blanco	94 °C por 5 min, 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94 °C por 15s, hibridación y extensión a 60 °C por 1 min.	23 (5,70%) de 405 LCR fueron positivos por SSPBRT-PCR; 3 casos de HHV-6A y 20 casos de HHV-6B. La tasa positiva de HHV-6B fue más alta que la de HHV-6A (P = 0.0004). Sensibilidad del 95,24% y especificidad del 99,22%, para SSPBRT-PCR	SSPBRT-PCR puede proporcionar resultados rápidos, sensibles y específicos para la identificación de HHV-6A y HHV-6B y el manejo de la encefalitis por HHV-6.

Bressollett e-Bodin et al., 2014	Desarrollar herramientas moleculares para la detección y cuantificación de ARNm de HHV-6 que se pueden usar en un entorno clínico	60 muestras de sangre total de 17 pacientes trasplantados con células madre (ADN de HHV-6 > 1000 o dos cargas de ADN entre 100 y 1000 copias/ml)	ARNm de genes tempranos inmediatos de U90 y genes tardíos de U100	42 °C por 5 min, 94 °C por 10 s y 45 ciclos de 94 °C por 5s, 57 °C (U90 o GAPDH) o 59 °C (U100) por 20s, 72 °C durante 15s.	Resultados cualitativos para ADN del HHV-6, ARN U90 y ARN U100 fue bueno. Cargas de ADN de HHV-6 fueron más altas que las de ARNm. En muestras clínicas, las cantidades de ARNm de U100 y U90 fueron bajas y se asoció con cargas de ADN viral >1000 copias/ml de sangre.	Ensayos de qPCR-RT son métodos sensibles y confiables para el monitoreo de la transcripción viral. Su detección está asociada a altas cargas de ADN in vivo y pueden ser herramientas útiles para el diagnóstico de infección activa.
Hill et al., 2016	Identificar eficientemente en individuos afectados por ciHHV-6. Facilitar estudios más amplios de importancia clínica del ciHHV-6 como estrategias de pruebas eficientes.	2496 muestras celulares. Grupos de 12 muestras se determinó HHV-6 con qPCR, en muestras individuales positivas altas se detectó ciHHV-6 por PCR digital	5R(A): GTT AGG ATA TACCGA TGT GCG TGA T. 5R(B): TAC AGA TAC GGA GGC AAT AGA TTTG. 5R(P): FAM-TCC GAA ACA ACT GTC TGA CTG GCAAAA-TAMRA	50°C por 2 min y 95°C por 15 min, 45 ciclos de 94°C por 1 min y 60°C por 1 min.	31 grupos tuvieron ADN de HHV-6 positiva alta >10 ³ copias/µg. Cada grupo tenía una muestra >10 ⁴ copias/ug de ADN de HHV-6. El ciHHV-6 heredado se confirmó con ddPCR en una muestra muy positiva >10 ³ copias/µg de ADN de HHV-6	El ciHHV-6 hereditario se puede identificar de manera eficiente mediante el agrupamiento de muestras junto con las modernas técnicas moleculares. Este algoritmo puede utilizarse para facilitar la identificación rentable de pacientes con ciHHV-6
Tamae Ohyea et al., 2016	Establecieron un método basado en PCR para producir sondas FISH para detectar el sitio de integración cromosómica de iciHHV-6A. Kit: LA Taq (Takara, Japan)	Analizaron 13 casos japoneses con sospechaba de HHV-6A o -6B, en muestras de sangre periférica por qPCR	H6TA1, TTTGCAGTCATCACGA TCGG; H6TA2, AGAGCGA-CAAATTGGAGGTTTC; sonda, AAGCCACAGCAGCCA. Estos amplifican los genomas iciHHV-6A y -6B. Gen U31	98 °C por 2,5 min, 35 ciclos a 98 °C por 10s y 60 °C por 10 min, extensión final a 60 °C por 10 min. El ADN genómico de HHV-6B, cepa Z29 se utilizó como plantilla de PCR.	Confirmaron que las señales de HHV-6 se ubicaron de manera constante en la región telomérica en los 13 individuos iciHHV-6 examinados.	Este método proporciona un enfoque simple y rápido para el diagnóstico de iciHHV-6 en el laboratorio clínico.
Yip et al., 2017	Compararon el rendimiento de un PCR cuantitativo de HHV-6 desarrollado internamente con un kit disponible en el mercado RealStar® HHV-6 PCR Kit.	72 muestras clínicas y 17 muestra control: 66 plasma, 3 CSF, 1 aspirado nasofaríngeo, 1 lavado broncoalveolar y 1 biopsia de hígado	Patrón plasmídico utilizando el vector pCRII-TOPO (Invitrogen, San Diego, CA, EE. UU.) Clonado con un inserto blanco del gen U65-66 de 176 pb de HHV-6	50 °C por 2 minutos y 95 °C por 10 minutos, 50 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto	Rango dinámico de 10 ² a 10 ¹⁰ DNA copias/ml y coeficiente de determinación (R ²) de 0.999 para el ensayo interno. La precisión del ensayo altamente reproducible con coeficientes de varianza 0.27% y 4.37%.	El método desarrollado qPCR para HHV-6 es sensible y confiable con menor costo para la detección y cuantificación del ADN del HHV-6 en comparación con el RealStar® HHV-6 PCR Kit.

5. METODOLOGÍA

5.1. DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.

El objeto de este estudio fue implementar el método de qPCR para la identificación del virus HVH-6. Para tal fin, se seleccionó el KIT comercial CMV, HVH-6,7,8 R-gene™ marca QIAGEN que identifica la carga viral de los virus HVH-5, HVH-6, y HVH-7 y se ajusta al equipo QuantStudio 3 de Thermofisher del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca. Para la implementación de este kit se tuvo en cuenta el kit de extracción de ADN recomendado por la casa comercial y las indicaciones del fabricante en cuanto a la manipulación de las muestras y su almacenamiento. El kit de qPCR, utiliza la tecnología Taqman de la nucleasa 5' también llamada sondas de hidrolisis, la mezcla de amplificación que incluye dNTPs, tampón de amplificación, Taq polimerasa, sondas específicas para cada virus y sus cebadores y sondas específicas para el control interno. Como controles de proceso de la técnica se incluyeron curva de calibración de 4 concentraciones diferentes, un control interno de extracción e inhibición, control de sensibilidad, un control negativo y los criterios de validación de la prueba; Todas estas características están descritas detalladamente en la metodología.

Esta prueba fue realizada en 30 personas sintomáticas que de acuerdo a criterios clínicos clasificados en la **tabla 5**, se consideraban “Sospechosos” de la infección por el virus HVH-6. Los sujetos “Sospechosos”, hace referencia a los pacientes que en los últimos 6 meses y hasta la toma de la muestra habían tenido signos y síntomas clínicos presuntivos de padecer enfermedad por el HVH-6, tiempo estimado para que se presente la reactivación del virus. Adicionalmente, esta prueba se realizó en un grupo de 18 personas sin manifestaciones clínicas en el momento de la toma de la muestra, los cuales fueron denominados como “No Sospechosos” para HVH-6. Los participantes hombres y mujeres mayores de 18 años, fueron captados durante el mes de enero del año 2017, hasta enero del año 2018, a todos los participantes se les solicitó firmar consentimiento informado y se les realizó una toma

de muestras sanguíneas y orina, para la realización de la qPCR, TT y ELISA anti IgG para HVH-6.

5.2. CÁLCULO DE MUESTRA

Teniendo en cuenta que la población del departamento del Cauca es de un millón cuatrocientos cuatro mil trescientos trece habitantes (1.404.313) y que la incidencia a nivel mundial y de Latinoamérica de HVH-6 alcanza el 98%, se calcula el número muestral aplicando la fórmula para población general:

$$\eta = \frac{Z^2PQ}{E^2}$$

$$\eta = \frac{(1.96)^2(0.98)(0.02)}{(0.05^2)} = 30.04$$

Aplicado al número de habitantes del departamento del Cauca la fórmula es:

$$\eta_f = \frac{fZ^2PQ}{fE^2 + Z^2PQ}$$

$$\eta_f = \frac{(1.404.313) (1.96)^2(0.98)(0.02)}{(1.404.313)(0.05^2) + (1.96)^2(0.98)(0.02)} = 30.10$$

Dónde:

- $Z= 1.96$ (Error aceptado bajo condiciones de normalidad).
- $P= 0.98$ (Número de proporción de incidencia)
- $Q= 0.02$ (Resta con la incidencia)
- $E= 0.05$ (5% Error estándar)
- $F= 1.404.313$ (Número de habitantes del departamento del Cauca)

El número de muestra tomado para el presente estudio fue de 30 pacientes con sospecha diagnóstica de infección por herpes virus humano tipo 6.

5.3. DESCRIPCIÓN DE PARTICIPANTES Y TOMA DE MUESTRAS

5.3.1. Criterios de inclusión. Se incluyeron personas mayores de 18 años de edad, que en el momento de ingresar al estudio habitaban en el Departamento del Cauca y presentaban dos o más de las siguientes manifestaciones clínicas: neurológicas, dermatológicas o síndrome de fatiga crónica (**Tabla 5**), que libremente aceptaron participar en el estudio y firmaron el documento de consentimiento informado (**Anexo 1**).

5.3.2. Criterios de exclusión. Se excluyeron personas con algún estado de inmunosupresión como: VIH positivos, diabéticos, con tratamiento por medicamentos inmunosupresores, con alguna otra inmunodeficiencia o que al momento del ingreso presente alguna enfermedad infecciosa comprobada; quienes se encontraban recibiendo tratamiento antiviral o se negasen a firmar el consentimiento informado.

5.3.3. Captación de los pacientes y toma de muestras. Se captaron treinta (30) pacientes durante la consulta particular del médico inmunólogo Julio César Klínger Hernández, en las instalaciones de la Fundación Julio Klínger. Los pacientes presentaron características clínicas presuntivas de la presencia de infección por HVH-6 que incluyen manifestaciones generales, neurológicas, de fatiga crónica y las dermatológicas, documentadas para HVH-6 en la literatura y que fueron agrupadas en la **Tabla 5** de este estudio. Estos participantes fueron ampliamente informados acerca del estudio y remitidos al laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca. Adicionalmente, se incluyeron 18 personas denominadas “No Sospechosas” (sin signos o

síntomas presuntivos de HVH-6, o cualquier otra enfermedad en el momento de la toma de la muestra), con edad y sexo similares al grupo de “Sospechosos”.

A continuación, los participantes firmaron un consentimiento informado (**Anexo 1**), y respondieron una encuesta (**Anexo 2**), este procedimiento fue acompañado por tres estudiantes del programa de medicina, quienes adicionalmente realizaron un examen físico, toma de signos vitales y toma de fotografías de las manifestaciones clínicas más sobresalientes (dermatológicas), con el objetivo de complementar la historia clínica y confirmar criterios de inclusión y exclusión. Los datos fueron consignados y archivados de acuerdo con los protocolos establecidos en los manuales de procesamiento de muestras del Laboratorio de Inmunología para su correspondiente análisis.

Para finalizar se procedió con la recolección de dos muestras de sangre (máximo 7 ml); de una de ellas se obtuvo dos alícuotas de suero, que fueron utilizados para detección de HVH-6, HVH-5 y HVH-7 por qPCR y para la realización del ELISA de IgG de HVH-6 y VIH ¹/₂, y una segunda muestra de sangre para la obtención y almacenamiento de plasma para usarlo como reserva. Los sueros y plasmas fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento (**Figura 4**). Simultáneamente se solicitó muestra de orina para realizar el TT (aproximadamente de 30 ml). Las muestras fueron manipuladas con las debidas técnicas de bioseguridad y de conservación dentro del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular.



Figura 4. Sistema de Almacenamiento de muestras. La imagen muestra crioviales de 1.5 ml, donde se almacenaron 0.8 ml de muestras de suero y plasma, los cuales fueron codificados y almacenados a -20°C , hasta su procesamiento en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca.

5.4. TÉCNICAS MOLECULARES Y DIAGNÓSTICAS PARA DETECCIÓN DE HVH-6

5.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) para detección de ADN de HVH-6. Para realizar este procedimiento se adquirieron dos Kit comerciales; uno para extracción de ácidos nucleicos denominado *DNeasy Blood and Tissue* para ADN viral (marca *QIAGEN*, de Ref. 69504), con sensibilidad del 95% y especificidad de 92-97%; un segundo kit para qPCR múltiples cuantitativo para detectar y medir carga viral para *CMV, HVH-6,7,8 R-gene™* (marca *ARgene*, de Ref. 69-100), que amplifica simultáneamente ADN de HVH-6 con HVH-5, HVH-7 y HVH-8, con sensibilidad analítica o límite de detección del 95% (510 copias/ml de genoma de HVH-6 y 410 copias/ml de genoma de HVH-5) y especificidad del 96% para qPCR y 97% con PCR cualitativo. Por ser de interés en el diagnóstico diferencial de HVH-6 y para la validación interna de la prueba se realizó simultáneamente la detección de ADN de HVH-5 (con capacidad para procesar 60 muestras de cada uno) y como valor

agregado a este estudio se realizó el HVH-7 (con capacidad para procesar 24 muestras). Este kit amplifica secuencias virales de interés que son:

- A.** HVH-5. Gen que codifica para la proteína ppUL83. Tamaño del fragmento amplificado: 183 pares de bases.
- B.** HVH-6. Gen que codifica U53. Tamaño del fragmento amplificado: 116 pares de bases. (Proteasa. Codifica una proteína de ensamble de la cápside viral).
- C.** HVH-7. Gen que codifica U42. Tamaño del fragmento amplificado: 123 pares de bases.

Estos ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.4.1.1. Extracción de ADN con kit *DNeasy Blood and Tissue*. Se realizó la extracción de ADN viral a partir de muestras de sueros previamente recolectados y almacenados a -20°C. A continuación, en viales de 1.5 ml marcados previamente, se mezcla 200 µl de buffer **AL** (dilución), 20 µl de Proteínasa, 10 µl del reactivo **IC2** (control interno positivo de extracción e inhibición); a esta premezcla y en tubos por separado, se adiciona 200 µl de control **WO** (control interno negativo de extracción e inhibición) y 200 µl de cada muestra a analizar. Se incuba durante 10 minutos a 56°C, se agrega 200 µl de etanol (99%). Las muestras se transfieren dentro de las columnas DNeasy Mini Spin y se centrifugan a 8.000 r.p.m por un minuto. Se cambia de tubo, se adiciona 500 µl de buffer **AW1** (lavados) y se centrifuga a 8.000 r.p.m por un minuto. Se repite el procedimiento anterior y se adiciona 500 µl de buffer **AW2** (lavados), se centrifuga a 14.000 r.p.m por tres (3) minutos. Por último, se cambia de tubo, se agrega 50 µl de buffer **AE** (elución), se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 8.000 r.p.m. El ADN extraído se cuantifica en el *GeneQuant* con lecturas a 230, 260 y 280 nm y se almacena a -20°C, hasta el siguiente procedimiento.

5.4.1.2. Amplificación de ADN con CMV, HHV-6,7,8 R-gene™. Se realizaron los siguientes pasos: en tubos para PCR de 200 µl previamente marcados (**Tabla 3**), se adiciona 10 µl de Premix: DNTPs, Taq Polimerasa, sondas y cebadores específicos para cada virus y para el IC2 marcadas con un fluorocromos (**FAM** y **VIC**), Cl₂Mg y agua grado molecular, con 15 µl de cada muestra a analizar, cada estándar de la curva de calibración (**QS1**: 1'250.000 copias/ml, **QS2**: 125.000 copias/ml, **QS3**: 12.500 copias/ml y **QS4**: 1.250 copias/ml), control de extracción e inhibición **WO**, control de sensibilidad **SC** y control negativo **RO** (incluidos en el kit), estas mezclas se llevan al termociclador en tiempo real para continuar el proceso de amplificación.

Tabla 3. Protocolo de montaje de qPCR. Protocolo de montaje de muestras y controles para cuantificación de ADN por qPCR para el Klit **CMV, HHV-6,7,8 R-gene™**

Tipo de Muestra	Volumen de Muestra/µl	R5 –Premezcla* de amplificación CMV e IC2/µl	R6 –Premezcla* de amplificación HHV-6/µl	R7 –Premezcla* de amplificación HHV-7/µl
IC2+W0 -Control interno 2/Agua grado PCR	10	15	15	15
R0 -H2O grado PCR	10	15	15	15
QS1 -Estándar de cuantificación 1	10	15	15	15
QS2 -Estándar de cuantificación 2	10	15	15	15
QS3 -Estándar de cuantificación 3	10	15	15	15
QS4 -Estándar de cuantificación 4	10	15	15	15
SC -Control de sensibilidad	10	15	15	15
Muestras desconocidas (η=30)	10	15	15	15

*Premezcla: DNTPs, Taq pol, Cl₂Mg, H2O grado PCR, Sondas y Cebadores específicos.

Los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión se realizaron de forma automatizada en el equipo *QuantStudio 3, Thermo Fisher Scientific (Figura 5)*, que incluyó las siguientes condiciones: activación de la Taq Polimerasa 15 min a 95°C por 1 ciclo, amplificación y desnaturalización 10s a 95°C por 45 ciclos, hibridación y extensión 40s a 60°C por 45 ciclos, tiempo aproximado de corrida 1.30 horas.

El monitoreo, análisis y cuantificación del ADN se efectuó mediante el software *QuantStudio™ Desing & Analysis v1.4*, que detecta la señal del fluorocromo “FAM” de las muestras, QS, SC, WO y RO en el canal a 530 nm y del fluorocromo “VIC” del IC2muestras e IC2WO en el canal a 560 nm y establece el valor del “Threshold”, umbral o línea basal.

Los resultados fueron expresados en número de copias/ml de ADN viral por muestra, teniendo en cuenta la línea del umbral dada por la curva de calibración y calculando la señal detectable (CT) para cada muestra. La cuantificación para HVH-6 y HVH-5 es lineal de 500 copias/ml a 10⁷ copias/ml.

Estos parámetros se cumplieron en su totalidad para validar la prueba.

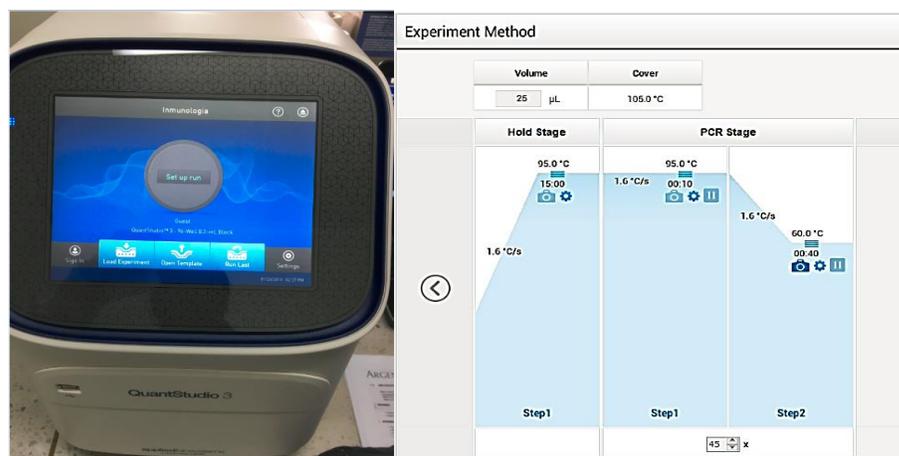


Figura 5. Sistema de cuantificación qPCR. Equipo *QuantStudio 3*, de *Thermo Fisher Scientific* y programa usado *QuantStudio™ Desing & Analysis v1.4*, para amplificación de muestras de qPCR y detección de ADN viral de HVH-6, HVH-5 y HVH-7. Fuente propia del autor.

5.4.2. Ensayo inmunoenzimático IgG para HVH-6. Se Tomaron 5 ml de sangre venosa de cada paciente utilizando tubos vacutainer sin anticoagulante (tapa roja). El suero se obtuvo por centrifugación a 3.500 r.p.m. (10 min.) y se almacenó dos alícuotas de 1 ml a -20°C, una para las pruebas de ELISA-PCR y otra alícuota de reserva. (**Figura 4**). El ensayo de ELISA anti-HVH-6 se realizó utilizando el kit comercial: HHV-6 IgG ELISA Kit (Marca Abnova, Ref. KA1457), con sensibilidad del 99% y especificidad de 95% y validado para diagnóstico en muestras de suero humano. El procedimiento se desarrolló siguiendo las recomendaciones del fabricante, este kit permite la detección de las inmunoglobulinas tipo IgG anti HVH-6 presentes en el suero del paciente.

Descripción del procedimiento: los sueros de participantes y controles internos del kit (control positivo, control negativo y estándar-1) se diluyeron 1/100 y se incubaron por duplicado en un volumen de 100 µl por pozo durante 60 minutos a temperatura ambiente en placas de ELISA (96 pozos) previamente sensibilizadas con antígeno nativo de HVH-6. Los anticuerpos no unidos fueron removidos mediante una solución de lavado con PBS + 0,05% Tween 20. Posteriormente, se adicionó el conjugado formado por anticuerpos anti-IgG humanos (anticuerpos secundarios) marcados con la enzima peroxidasa, se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y se realizó un segundo lavado con la solución de PBS + 0,05% Tween 20. La reacción se revela tras la adición de un sustrato cromogénico (tetrametilbenzidina) y después de 20 minutos de incubación se adicionó la solución de parada. La lectura de las densidades ópticas a 450-620 nanómetros se realizó en un lector de ELISA (Marca Awareness de ANNAR Diagnostic).

Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales (UI/ml), obtenidas al dividir el valor de la densidad óptica obtenida de la muestra del paciente sobre el valor del “punto de corte” (se obtiene al multiplicar el estándar 1 por el factor de corrección suministrado en el inserto del kit). Los valores de referencia son: positivos mayores a 110 UI/ml,

indeterminado entre 90-110 UI/ml y negativo menor a 90 UI/ml, de anticuerpos IgG anti-HVH-6.

Simultáneamente se realizó la técnica de ELISA para VIH-1/2 (Murex HIV Ag/Ab Combination, Ref. 7G79-09/-11), cuyos resultados se tuvieron en cuenta como criterio de inclusión para quienes presentaran anticuerpos anti-VIH negativos (valores inferiores al punto de corte de 0.90 UI).

5.4.3. TEST DE TZANCK. El procedimiento se le realizó a todos los participantes, se les procesó una muestra de orina obtenida por misión espontánea. 15 ml de orina fueron centrifugados a 3.500 r.p.m (10 min), se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento urinario y se extendieron dos gotas en láminas portaobjeto por duplicado. Las láminas secas se fijaron con etanol absoluto y se colorearon con Giemsa y Wright, para su correspondiente lectura en el microscopio de luz, mediante la observación directa con lente 40X y 100X (**Figura 8**), las lecturas se realizaron por triplicado. Los resultados se reportaron como “positivo” o “negativo”, de acuerdo a la presencia o ausencia de efectos citopáticos observados en las células del sedimento urinario.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en este estudio fueron tabulados y almacenados en hojas de Excel y llevadas a hojas de análisis de Stata. A los datos se les realizó medidas de tendencia central como media, mediana, porcentajes y percentiles. De acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, los datos tienen una distribución no paramétrica, por tanto, los análisis multifactoriales para determinar la asociación de las pruebas de laboratorio entre los dos grupos frente a los análisis de las variables clínicas, se analizaron con la prueba U de Mann Whitney y las variables categóricas mediante la prueba Fisher, estos análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Stata v12.0.

5.6. CONSIDERACIONES ÉTICO-LEGALES

Todas las consideraciones ético-legales como: la confidencialidad, la participación voluntaria, deberes, derechos, riesgos, beneficios y publicación de resultados, se encuentran en el consentimiento informado (**Anexo 1**). En todos los casos, el documento de consentimiento informado lleva la firma y dirección de un testigo, generalmente un familiar del participante (Ministerio de Salud, 1993). Esta propuesta ha sido evaluada y aprobada por el Comité de ética de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca-Popayán (**Anexo 3**).

Al realizar la toma de muestras clínicas de cada paciente; agujas, tubos vacutainer, algodones, servilletas, curas, guantes y material descartable, son manejados de acuerdo con las normas de bioseguridad establecidas (Código Helsinki-Código Nuremberg resolución 008430 de 1993, que rigen la ética en la investigación científica en Colombia) y en los protocolos establecidos en el Laboratorio de Inmunología en: Manual toma de Muestras (**PM-FO-8.2-MN-1**), Manual de limpieza, desinfección y esterilización (**PM-IS-8.2-MN-4**) y en el manual de Manejo de residuos de laboratorios (**PM-IS-8.2-MN-5**).

6. RESULTADOS

6.1. DESCRIPCIÓN SOCIODEMOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN

Los datos sociodemográficos se discriminan en la **Tabla 4**. En general para todos los participantes ($n=48$) en este estudio, se encontró que el género fue del 35.4% ($n=17$) para masculino y del 64.6% ($n=31$) para femenino. La edad media y rango fue de 45.5 (20-79) años. El nivel de escolaridad fue predominantemente Universitario con un 47.9% ($n=23$), seguida por la Secundaria y Técnica con 20.8% ($n=10$). En el estrato social predominó la clase media con un 58.3%.

Para la procedencia se agruparon los municipios en categorías, así:

- a) Sin datos: el 6.2% ($n=3$).
- b) Zona Popayán con la mayor frecuencia de 41.7% ($n=20$).
- c) Zona Sur: Mercaderes, Argelia, Balboa, Patía, La Vega, Almaguer y Bolívar con el 31.2% ($n=15$).
- d) Zona Centro: Silvia, Tambo, La Sierra, Cajibío y El Rosario con el 8.3% ($n=4$).
- e) Zona Norte: Santander de Quilichao con el 2.1% ($n=1$).
- f) Otros: el 10.4% ($n=5$).

Tabla 4. Descripción de datos Sociodemográficos. Discriminación de datos sociodemográficos analizados para los grupos de Sospechosos y No Sospechosos de infección por HVH-6, obtenidos a partir de la encuesta (**Anexo 2.**).

		Sospechosos n=30 η(%)	No Sospechosos n=18 η(%)
GÉNERO	Masculino	10 (20.83)	7 (14.58)
	Femenino	20 (41.66)	11 (22.91)
EDAD MEDIA-RANGO		47.80 (21-79)	43.27 (20-77)
PROCEDENCIA	Sin Dato	2 (4.17)	1 (2.08)
	Popayán	12(25.00)	8 (16.67)
	Sur	8 (16.67)	7 (14.57)
	Centro	3 (6.25)	1 (2.08)
	Norte	0 (0.00)	1 (2.08)
	Otros	5 (10.42)	0 (0.00)
ESCOLARIDAD	Ninguna	0 (0.00)	1 (2.08)
	Primaria	4 (8.33)	0 (0.00)
	Secundaria	8 (16.67)	2 (4.17)
	Técnica	7 (14.58)	3 (6.25)
	Universitaria	11 (22.92)	12 (25.00)
ESTRATO SOCIOECONÓMICO	1 y 2 (Bajo)	8 (16.67)	3 (6.25)
	3 y 4 (Medio)	13 (27.08)	15 (31.25)
	5 y 6 (Alto)	9 (18.75)	0 (0.00)
ESTADO CIVIL	Soltero	13 (27.08)	9 (18.75)
	Casado	11 (22.92)	6 (12.50)
	Unión Libre	4 (8.33)	1 (2.08)
	Otro	2 (4.17)	2 (4.17)
ICM* (KG/M2)	Normal	17 (35.42)	8 (16.67)
	Sobre peso /Obesidad	13 (27.08)	10 (20.83)

* ICM: Índice de Masa Corporal

6.2. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE qPCR PARA HVH-6.

La validación de la prueba de qPCR para HVH-6 se realizó usando la corrida del kit para HVH-5 (**Figura 6**), debido a que este protocolo porta el fago de DNA (IC2) para todas las muestras (control de extracción e inhibición) y cumplió los siguientes criterios:

- a) Los controles internos de amplificación e inhibición IC2, se detectaron en VIC para el control negativo WOIII y WOI (CT= 27,629 y 28,473) y en las muestras tamizadas ($n=48$) (en la **Figura 6 y 7** se presentan 3 ejemplos).
- b) La curva de calibración de los QS se detectó en FAM, el CT para QS3 fue de 32,262 (debe estar entre 30 y 35 ciclos), el software del equipo trazó la curva de calibración (**Figura 8**) y el umbral o threshold fue 42.178.798.
- c) El control de sensibilidad CS de la prueba estuvo dentro de los rangos referenciados en el Kit (366 copias/ml).
- d) El control negativo RO (agua grado PCR), no amplificó para DNA de HVH-5 (INDETECTABLE).
- e) El "Slope" fue de: -3.772 (rango $-3.917 < \text{Slope} < -3.103$).

Estos mismos parámetros se tuvieron en cuenta para validar los datos generados para qPCR de HVH-6 (**Figura 12**) y HVH-7.

Block Type+A1:N28 96-Well 0.2-mL Block
 Chemistry TAQMAN
 Experiment File Name D:\Users\Administrator\Desktop\CMV\CMV_PROYID4477.eds
 Experiment Name CMV PRUEBA
 Experiment Run End Time 2018-01-27 12:29:40 PM PST
 Experiment Type Standard Curve
 Instrument Name Inmunologia
 Instrument Type QuantStudio™ 3 System
 Quantification Cycle Method Ct
 User Name GIAG

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	Reporter	CT	Ct Mean	Quantity	Y-Intercept	R(superscript 2)	Slope	Ct Threshold
20	B8	WO III	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
20	B8	WO III	Target 2	VIC	27,629	27,629					5.501,841
91	H7	WO I	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
91	H7	WO I	Target 2	VIC	28,473	28,473					5.501,841
31	C7	QS4	Target 1	FAM	36,394	36,394	1.250,000	47,986	0,998	-3,772	42.178,798
43	D7	QS4	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
43	D7	QS3	Target 1	FAM	32,261	32,261	12.500,000	47,986	0,998	-3,772	42.178,798
43	D7	QS3	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
55	E7	QS2	Target 1	FAM	29,043	29,043	125.000,000	47,986	0,998	-3,772	42.178,798
55	E7	QS2	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
67	F7	QS1	Target 1	FAM	24,893	24,893	1.250.000,000	47,986	0,998	-3,772	42.178,798
67	F7	QS1	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
79	G7	CS	Target 1	FAM	38,313	38,313	366,923	47,986	0,998	-3,772	42.178,798
79	G7	CS	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
8	A8	RO	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
8	A8	RO	Target 2	VIC	Undetermined						5.501,841
1	A1	001	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
1	A1	001	Target 2	VIC	30,778	30,778					5.501,841
2	A2	010	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
2	A2	010	Target 2	VIC	29,989	29,989					5.501,841
3	A3	021	Target 1	FAM	Undetermined			47,986	0,998	-3,772	42.178,798
3	A3	021	Target 2	VIC	29,211	29,211					5.501,841

Figura 6. Datos experimentales de qPCR para HVH-5. Imagen generada por el equipo de qPCR para HVH-5, mediante el programa de análisis *QuantStudio™ Desing & Analysis v1.4*, en el que se observan los resultados obtenidos para los controles negativos WO, la curva de calibración QS4/QS3/QS2/QS1, el control de sensibilidad CS, control negativo de amplificación RO y tres muestras de pacientes A1/A2/A3.

Block Type: 96-Well 0.2-mL Block
 Chemistry: TAQMAN
 Experiment File Name: D:\Users\Administrator\Desktop\HHV 6\lorena.eds
 Experiment Name: HHV6 PROGRAMA
 Experiment Run End Time: 2018-01-27 08:44:08 AM PST
 Experiment Type: Standard Curve
 Instrument Name: Inmunologia
 Instrument Type: QuantStudio™ 3 System
 Quantification Cycle Method: Ct
 User Name: GIAG

Well	Well Position	Sample Name	Target Name	Reporter	CT	Quantity	Y-Intercept	R(superscript 2)	Slope	Ct Threshold
8	A8	WO II	Target 1	FAM	Undetermined		44,094	0,998	-3,727	11.750,298
8	A8	WO II	Target 2	VIC	31,790					11.750,298
91	H7	WO I	Target 1	FAM	Undetermined		44,094	0,998	-3,727	11.750,298
91	H7	WO I	Target 2	VIC	29,109					11.750,298
31	C7	QS4	Target 1	FAM	32,677	1.250,000	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
31	C7	QS4	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
43	D7	QS3	Target 1	FAM	28,531	12.500,000	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
43	D7	QS3	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
55	E7	QS2	Target 1	FAM	25,306	125.000,000	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
55	E7	QS2	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
67	F7	QS1	Target 1	FAM	21,328	1.250.000,000	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
67	F7	QS1	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
79	G7	SC	Target 1	FAM	33,967	521,125	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
79	G7	SC	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
20	B8	RO	Target 1	FAM	Undetermined		44,094	0,998	-3,727	11.750,298
20	B8	RO	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
6	A6	46	Target 1	FAM	44,535	0,761	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
6	A6	46	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
16	B4	31	Target 1	FAM	40,347	10,121	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
16	B4	31	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298
90	H6	53	Target 1	FAM	29,109	10.484,973	44,094	0,998	-3,727	11.750,298
90	H6	53	Target 2	VIC	Undetermined					11.750,298

Figura 7. Datos experimentales de qPCR para HVH-6. Imagen generada por el equipo de qPCR para HVH-6, mediante el programa de análisis **QuantStudio™ Desing & Analysis v1.4**, en el que se observan los datos obtenidos para los controles negativos WO, la curva de calibración QS4/QS3/QS2/QS1, el control de sensibilidad CS, control negativo de amplificación RO, para validar los datos de tres muestras de pacientes positivas A6/B4/H6.

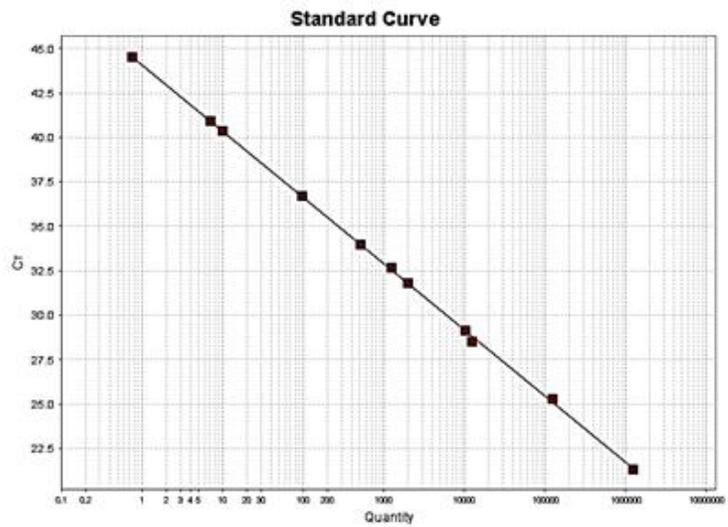
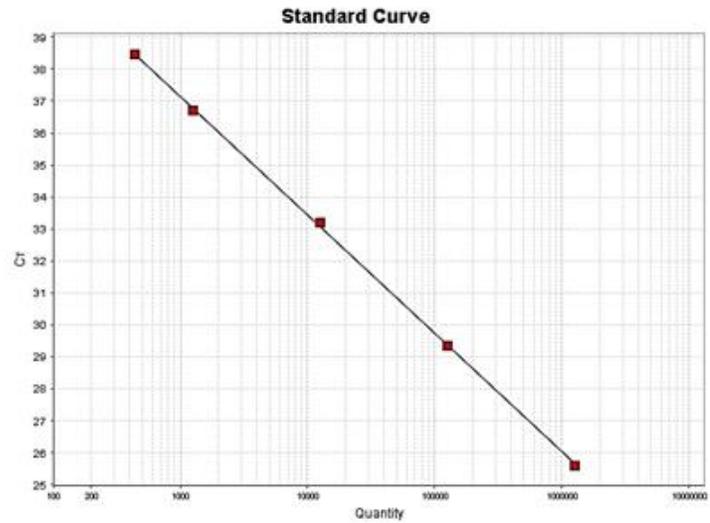


Figura 8. Curvas de calibración. La imagen muestra dos curvas de calibración generadas por el programa de análisis *QuantStudio™ Desing & Analysis v1.4*. La primera curva corresponde al qPCR de HVH-5 y la segunda curva a HVH-6, necesarias para la validación y cuantificación de técnica.

6.3. RESULTADOS DE qPCR.

La carga viral por qPCR se evaluó en todas las muestras incluidas en este estudio ($n=48$) para la detección de ADN de HVH-6 y HVH-5 (CMV), mientras que para HVH-7 se efectuó en $n=24$ de las muestras que fueron escogidas al azar por ser esta la capacidad del kit comercial de *ARgene* para HVH-7 (**Figura 9**). Las muestras que amplificaron ADN tanto para HVH-6, HVH-5 y HVH-7 fueron 11 (23%) entre los grupos, siendo 9 positivas en el grupo de los sospechosos y 2 en el grupo de los No sospechosos, es de aclarar que ninguna muestra amplificó para más de un virus a la vez.

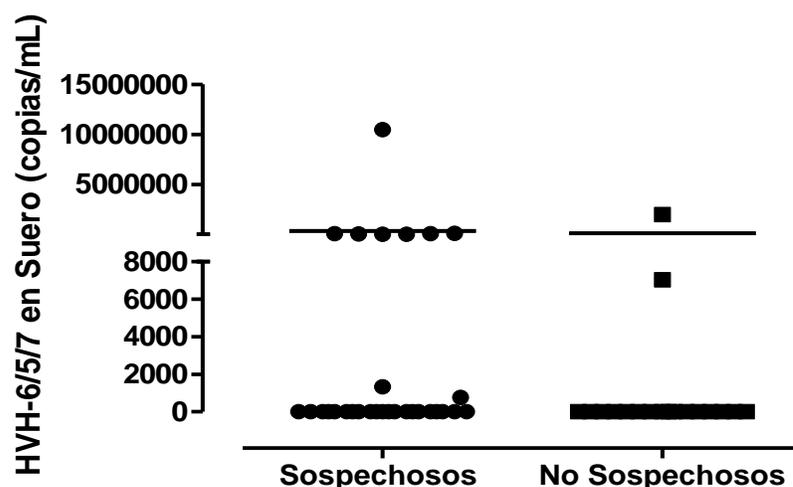


Figura 9. Resultados de qPCR para HVH-6/5/7. La figura muestra en el eje Y los resultados positivos de la carga viral por qPCR para HVH5/6/7 en número de copias virales de ADN por ml de suero y en el eje X los grupos analizados: Sospechosos y No Sospechosos de infección por HVH-6/5/7. No hubo significancia estadística ($p<0.005$). Los datos fueron comparados por el método de U de Mann Whitney.

6.3.1. Resultados qPCR para ADN de HVH-6. La amplificación del ADN viral de HVH-6 fue positiva en 8 de 48 muestras tamizadas (**Figura 10**), de las cuales el 12.5% ($n=6$) corresponden al grupo de Sospechosos con un valor medio de 357.335 de copias de ADN viral/ml (mínimo: 761 y máximo: 10.484.973) y el 4.17% ($n=2$) pertenecen al grupo de No Sospechosos, con valores medios de 111.523 (mínimo 7.032 y máximo: 2.000.398)

copias de ADN viral/ml. No se observó significancia estadística ($p=0.424$) al comparar los resultados positivos entre los dos grupos analizados.

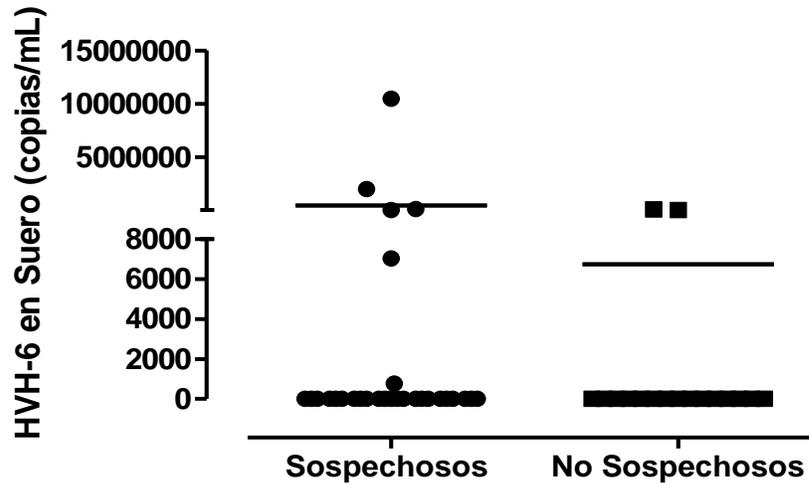


Figura 10. Resultados de qPCR para HVH-6. La figura muestra en el eje Y los positivos de la carga viral por qPCR para HVH-6 en número de copias virales de ADN por ml de suero y en el eje X los dos grupos analizados: Sospechosos y No Sospechosos de infección por HVH-6. No hubo significancia estadística ($p<0.005$). Los datos fueron comparados por el método de U de Mann Whitney.

6.3.2. Resultados qPCR para ADN de HVH-5/CMV. La carga viral de HVH-5 (CMV) dio positivo en el 4.17% ($n=2$), los dos corresponden al grupo de Sospechosos, con una media de 2.962 copias de ADN viral/ml y un rango que oscilo entre indetectable (menos de 10 copias/ml) y 87.538 copias/ml de ADN viral. No hubo significancia estadística ($p=0.263$) al comparar los resultados positivos entre los dos grupos analizados.

6.3.3. Resultados qPCR para ADN de HVH-7. El análisis de la carga viral de HVH-7 se realizó en 24 muestras de participantes seleccionados al azar, se obtuvo una muestra positiva en el grupo de los Sospechosos que equivale al 4.17% ($n=1$), con un valor de 40.625 copias/ml de ADN viral. No hubo significancia estadística ($p=0.648$) al comparar los resultados positivos entre los dos grupos analizados.

6.4. RESULTADOS DE ELISA IgG PARA HVH-6.

Los anticuerpos por el método de ELISA IgG para HVH-6 (Abnova), fueron positivos en el 85.5% ($n=48$) de los participantes. En el grupo de los Sospechosos fue positivo en el 86.7% ($n=26$) y negativo en el 13.3% ($n=4$), con valores medios y rangos de 315 (7-556) UI/ml. En los No Sospechosos fue positivo en el 83.3% ($n=15$) y negativo 16.6% ($n=3$), con valores medios y rangos de 257 (9-567) UI/ml (**Figura 11**), observándose títulos más altos en el grupo de los Sospechosos sin presentar significancia estadística ($p=0.751$). El valor de referencia Positivo es mayor a 110 UI/ml y Negativo para valores menores a 90 UI/ml.

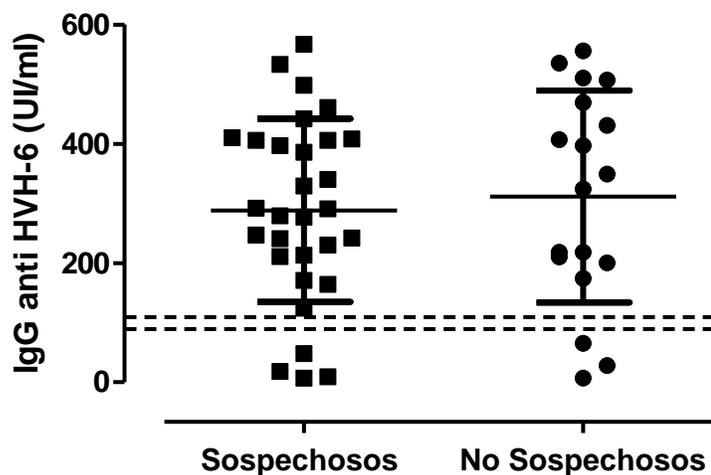


Figura 11. Resultados de IgG para HVH-6. La figura muestra la distribución de los resultados de la técnica de ELISA para IgG de HVH-6 en los dos grupos analizados, sospechosos y no sospechosos. La doble línea indica el punto de corte que corresponde a 90-110 UI/ml. En la parte superior los positivos (85.5%) y en la inferior los negativos (14.5%). No hubo significancia estadística ($p<0.005$). Los datos fueron comparados por el método de U de Mann Whitney.

6.5. RESULTADOS DEL TEST DE TZANCK.

Los cambios observados en las muestras analizadas positivas incluyen: células gigantes con núcleos megaloblásticos y/o binucleados, con cromatinas desplazadas y condensadas (**Figura 12**). En TT fue positivo 30% ($\eta=9$) Sospechosos, dando una significancia estadística mediante análisis de Fisher ($p=0.042$), al ser comparado con el grupo de No Sospechosos para los cuales el TT arrojó resultados negativos 0% ($\eta=0$) en su totalidad.

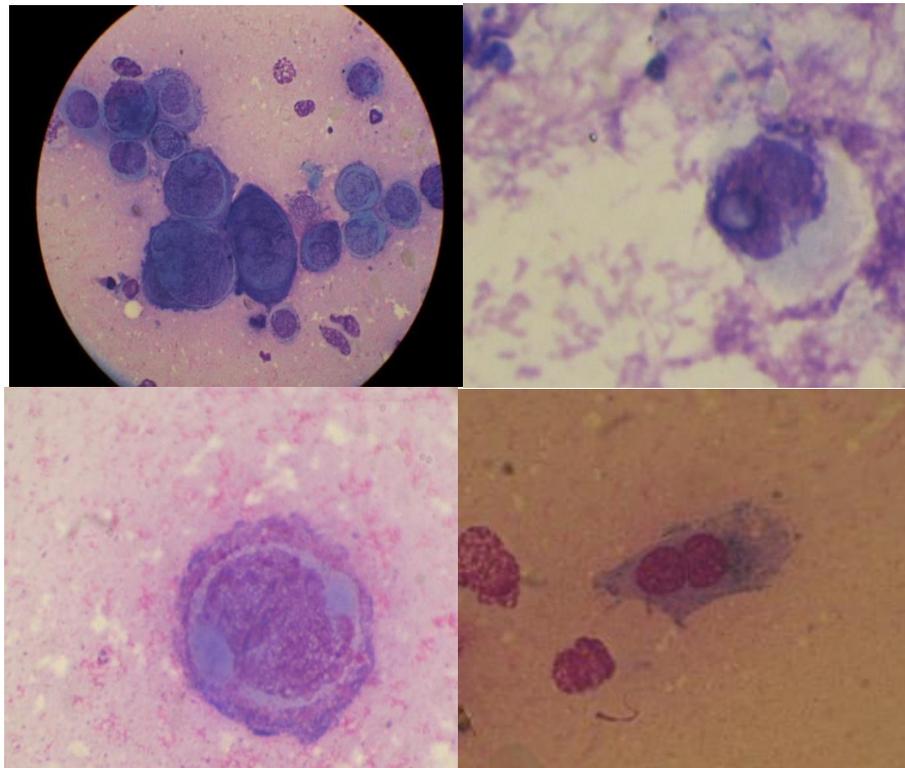


Figura 12. Test de Tzanck. Se observan imágenes de células gigantes binucleadas y multinucleadas, núcleos con cambios megaloblásticos y cromatinas desplazadas, en frotis de sedimento urinario de pacientes seropositivos y con sospechosa clínica de infección por HHV-6 (Lente 100X), analizados en el Laboratorio de Inmunología de la Universidad del Cauca. Fuente propia del autor.

6.6. CLASIFICACIÓN DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HVH-6

Se tuvieron en cuenta las manifestaciones clínicas presentadas en los últimos seis meses (tiempo estimado para que se genere la reactivación del HVH-6). Los resultados se presentan en la **Tabla 4**, donde las manifestaciones clínicas fueron agrupadas en cuatro categorías así:

- A. Síntomas generales:** Fiebre, dolor de cabeza, dolor de garganta, resequedad oral, úlceras en la boca, vómito, diarrea, pérdida de apetito, pérdida de peso.
- B. Síntomas neurológicos:** Depresión, decaimiento, pérdida de la memoria, pérdida de la concentración, fotofobia, irritación ocular.
- C. Síntomas de fatiga crónica:** Dolor en los nódulos linfáticos, dolor fibromuscular, dolor poliarticular, sueño alterado, sueño no reparador, malestar post-esfuerzo.
- D. Síntomas dermatológicos:** Exantema, roséola, vesículas, pápulas, puntos rubí, liquen plano, sensaciones extrañas en piel, hinchazón, equimosis, hiperqueratosis, lesiones sebáceas, híper e hipo pigmentación, prurito y lunares de carne.

6.7. PRESENCIA DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE HVH-6

Las manifestaciones clínicas tamizadas en el grupo de Sospechosos de infección por HVH-6 se presentan en la **Tabla 5**. Se observó la presencia de síntomas Generales en el 83% ($n=25$), con predominio de cefalea en el 63% ($n=19$) e hiporexia (pérdida del apetito) en el 56.7% ($n=17$). Las manifestaciones Neurológicas estaban presentes en el 96.6% ($n=29$), el porcentaje que mayor se presentó fue el decaimiento con un 73.3% ($n=22$), pérdida de la memoria del 70% ($n=19$) y pérdida de la concentración del 60% ($n=18$). Las manifestaciones de Fatiga Crónica se presentaron en el 93.3% ($n=28$), con mayor frecuencia se observó el sueño no reparador en un 73.3% ($n=22$), dolor fibromuscular en un 70% ($n=21$) y el malestar poliarticular en un 63.3% ($n=19$). Los síntomas Dermatológicos estuvieron presentes en el 86.6% ($n=26$), la mayor presencia fue de vesículas-maculas-pápulas con un 53.3% ($n=16$), el exantema, puntos rubí-lunares de carne en el 33.3% ($n=19$).

Tabla 5. Presencia de manifestaciones Clínicas. Se reporta el porcentaje de signos y síntomas observados en los Sospechosos de infección por HVH-6.

SÍNTOMAS		Presencia η(%)	Ausencia η(%)
GENERALES	Fiebre	10 (33,33)	20 (66,67)
	Cefalea	19 (63,33)	11 (36,67)
	Dolor de Garganta	11 (36,67)	19 (63,33)
	Xerostomía	9 (30,00)	21 (70,00)
	Ulceras/Boca	6 (20,00)	24 (80,00)
	Vómitos	7 (23,33)	23 (76,67)
	Diarrea	11 (36,67)	19 (63,33)
	Hiporexia	17 (56,67)	13 (43,33)
	Pérdida de peso	14 (46,67)	16 (53,33)
NEUROLÓGICOS	Depresión	17 (56,70)	13 (43,30)
	Decaimiento	22 (73,30)	8 (26,70)
	Perdida/memoria	21 (70,00)	9 (30,00)
	Perdida/concentración	18 (60,00)	12 (40,00)
	Fotofobia	7 (23,33)	23 (76,67)
	Irritación ocular	9 (30,00)	21 (70,00)
	Sensaciones extrañas en piel	15 (50,00)	15 (50,00)
FATIGA CRÓNICA	Linfadenitis cervical	7 (23,33)	23 (76,67)
	Linfadenitis axilar	9 (30,00)	21 (70,00)
	Dolor fibromuscular	21 (70,00)	30 (30,00)
	Dolor Poliarticular	19 (63,33)	11 (36,67)
	Sueño no reparador	22 (73,33)	8 (26,67)
	Malestar post esfuerzo	16 (53,30)	14 (46,70)
DERMATOLÓGICOS	Exantema	10 (33,33)	20 (66,67)
	Roseola	5 (16,67)	25 (83,33)
	Vesículas-Máculas-Pápulas	16 (53,33)	14 (46,66)
	Puntos Rubí-Lunares de Carne	10 (33,33)	20 (66,67)
	Liquen Plano	15 (50,00)	15 (50,00)
	Hinchazón	8 (26,67)	22 (73,33)
	Equimosis	1 (3,33)	29 (96,67)
	Hiperqueratosis	1 (3,33)	29 (96,67)
	Lesiones sebáceas	1 (3,33)	29 (96,67)
	Híper pigmentación	6 (20,00)	24 (80,00)
	Hipo pigmentación	3 (10,00)	27 (90,00)
Prurito	4 (13,33)	26 (86,67)	

6.8. ASOCIACIÓN DE VARIABLES DE LABORATORIO Y DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Al analizar los resultados de las muestras positivas para TT se observó que todas fueron positivas (100%) para la IgG de HVH-6 por ELISA (media: 355 UI/ml), y adicionalmente tres de estas muestras positivas para TT (33.3%) fueron simultáneamente positivas para qPCR de HVH-6 con 97.307, 10.121 y 10.484.973 copias/ml de ADN viral y una para qPCR de HVH-7 con 40.675 copias/ml de ADN viral. Presentando significancia estadística ($P=0.027$).

Al confrontar las muestras que fueron positivas para qPCR de HVH-6 ($n=8$) en el grupo de los Sospechosos con los anticuerpos IgG por ELISA de HVH-6, se encontró que el 87.5% fueron positivas para ambas pruebas, solamente un paciente fue negativo (12.5%) para la IgG, el cual presentó una carga viral de 10.121 copias/ml de ADN para HVH-6.

Se cruzaron los datos obtenidos de las pruebas de qPCR para HVH-6/5/7, ELISA IgG para HVH-6 y TT, con las diferentes manifestaciones clínicas (**Tabla 6**), se observó que hubo asociación estadísticamente significativa entre algunos síntomas clínicos y las pruebas de laboratorio mediante análisis Fisher ($P<0.05$). Entre las asociaciones positivas sobresalen:

- a) La qPCR de HVH-6 con: vómito, dado que 4 de 6 Sintomáticos positivos para la carga viral de HVH-6 exhibieron esta manifestación clínica, al igual que los puntos Rubí/lunares que estaban presentes en 5 de los 6 Sintomáticos qPCR+. Para la qPCR de HVH-6/5/7 la asociación fue con linfadenitis axilar y malestar post esfuerzo.
- b) El ELISA IgG para HVH-6 positivo y el malestar post esfuerzo estaban presentes en 16 de 26 Sintomáticos.
- c) Para el TT fueron la cefalea y la depresión, presentando una asociación negativa, lo que significa que estos síntomas son independientes de la positividad o negatividad de la prueba.

Tabla 6. Asociación de pruebas de laboratorio con manifestaciones clínicas. Se observa el cruce de las pruebas de laboratorio realizadas para HVH-6 con las manifestaciones clínicas presentadas. Resultado de significancias con la prueba de Fisher.

SÍNTOMAS	qPCR HVH6	qPCR HVH6/5/7	ELISA	TZANCK
GENERALES				
Fiebre	0.372	1.000	0.272	0.675
Cefalea	1.000	0.225	0.611	0.042*
Dolor de garganta	0.372	1.000	1.000	1.000
Ulcera	0.571	1.000	1.000	0.637
Vómito	0.016*	0.153	0.548	1.000
Diarrea	0.156	0.687	1.000	1.000
Hiporexia	1.000	0.443	0.113	0.443
Pérdida de peso	1.000	1.000	0.315	1.000
NEUROLÓGICOS				
Depresión	0.360	0.123	1.000	0.049*
Decaimiento	0.645	0.195	0.284	0.643
Pérdida/memoria	0.637	1.000	1.000	0.666
Pérdida/concentración	0.660	0.418	0.632	0.678
Fotofobia	0.290	0.393	1.000	0.143
Irritación ocular	0.329	0.389	0.563	1.000
Sensación Extraña en Piel	1.000	1.000	1.000	0.682
FATIGA CRÓNICA				
Linfadenitis cervical	0.290	0.071	1.000	1.000
Linfadenitis Axilar	0.141	0.029*	1.000	0.681
Dolor Fibromuscular	0.637	0.681	1.000	1.000
Dolor Poliarticular	1.000	1.000	0.611	0.225
Sueño No Reparador	1.000	1.000	0.550	0.195
Males post-esfuerzo	0.378	0.046*	0.037*	0.236
DERMATOLÓGICOS				
Exantema	1.000	1.000	1.000	1.000
Roseola	1.000	1.000	1.000	1.000
Vesículas, Pápulas, Maculas	1.000	0.440	1.000	0.694
Estrías	0.637	0.210	0.563	0.210
Puntos Rubí y Lunares	0.009*	0.115	0.584	0.115
Liquen Plano	1.000	1.000	1.000	1.000
Hinchazón	1.000	1.000	1.000	0.374
Equimosis	1.000	1.000	1.000	1.000
Lesiones sebáceas	0.200	0.300	1.000	1.000
Hiperpigmentación	0.571	0.329	1.000	0.329
hipopigmentación	0.501	1.000	0.360	1.000
Prurito	0.169	0.563	0.454	1.000

*Test de Fisher. $p < 0.005$

7. DISCUSIÓN

El HVH-6 es conocido por causar diferentes patologías en los seres humanos, por lo que cobra importancia un diagnóstico oportuno y eficaz. Existen métodos de diagnósticos para su identificación y cuantificación, sobresalen los que detectan Antígenos (cultivos celulares e IF), los que determinan la producción de anticuerpos (ELISAS, IFI, WB) y los métodos moleculares que identifican, confirman y cuantifican la presencia del genoma de HVH-6 (qPCR, PCR-RT y dPCR) (Karlsson et al., 2012; Tomás Pumarola Suñé, 2002; Yip et al., 2017). Estos métodos diagnósticos se consideran fáciles, rápidos y económicos de realizar en cualquier laboratorio. En este estudio se realizaron las pruebas de qPCR para HVH-6, HVH-5 y HVH-7, ELISA IgG HVH-6 y Test de Tzanck, para que queden implementadas y disponibles en la región. Adicionalmente, permitan una mayor correlación entre las manifestaciones clínicas de los pacientes con los resultados de laboratorio.

La validación de la prueba de qPCR para ADN de HVH-6 cumplió todos los parámetros establecidos en el inserto del kit usado en este estudio de la marca *ARgene* (curva de calibración, los controles internos de extracción e inhibición, control negativo y control de sensibilidad). Llama la atención que este kit identifica simultáneamente HVH6/5/7/8, y que los controles de extracción e inhibición de las muestras desconocidas se amplificaban con los reactivos de HVH-5, por lo que se debe realizar la qPCR de HVH-6 simultáneamente y usando la misma muestra extraída para su montaje. En el futuro este método de qPCR se deberá realizar con un kit específico solo para HVH-6, que lo identifique en forma separada de los otros herpes virus HVH-5/7/8 y preferiblemente que se clasifiquen los serotipos en HVH-6A y HVH-6B, para una mejor correlación clínico-laboratorio, ya que qPCR puede identificar y distinguir con precisión entre las especies A y B de HVH-6 (Geraldin A Dominguez, 1999). Se conocen sus diferencias serológicas, epidemiológicas, y genómicas, más recientemente se han diferenciado sus implicaciones clínicas, como por ejemplo que la cepa de HVH-6B se asocia mayormente con roseola infantum o rosácea, convulsión febril y epilepsia en niños y rechazo de órganos en trasplantados, mientras que el HVH-6A se asocia con enfermedades crónicas en los adultos como EM, encefalitis y

síndrome de fatiga crónica (Ablashi et al., 2014; H. Agut, Bonnafous, & Gautheret-Dejean, 2017; Collin & Flamand, 2017; Hansen, Bundgaard, Bilstoft, Rossen, & Hollsborg, 2017; Sotzny, 2018).

En este estudio se detectó una positividad del 12.5% para ADN de HVH-6 en el grupo de los Sospechosos, un porcentaje bajo a lo esperado en estos pacientes con múltiples manifestaciones clínicas, indicando que los niveles altos de ADN viral se podrían encontrar en los órganos afectados y no en circulación sanguínea, lo que podría explicarse por el tipo de muestra utilizado, ya que no se procesaron biopsias de piel u otro órgano, LCR u orina (J. A. Hill et al., 2016; Lou, Wu, Cai, Wu, & Shang, 2011; Yip et al., 2017). Por tanto, se puede deducir que un resultado negativo en suero o plasma no descarta una infección activa del HVH-6 o de los otros herpesvirus en un órgano o tejido blanco, por ejemplo: útero, cerebro, tiroides, hígado y piel (HVH-6 FOUNDATION, 2018).

Otro aspecto a tener en cuenta es el tipo de reactivos utilizados en el montaje de la técnica (el Kit de la marca *ARgene* fue importado de Estados Unidos), es muy importantes el tipo de cebadores o iniciadores (**Tabla 2**), ya que la selección debe hacerse buscando la identificación de secuencias más específicas y estables del genoma del HVH-6 a amplificar debido a su alta capacidad de mutación y teniendo en cuenta los serotipos HVH-6A y HVH-6B que circulan en cada región (Collin & Flamand, 2017; Dharam A, 2014; Engdahl, 2016), ya que presentan diferente distribución en los tejidos humanos, esto se ha evidenciado por que los dos virus difieren en su prevalencia en regiones geográficas separadas, datos que son desconocidos para esta área y la no discriminación entre HVH-6A Y HVH-6B podría ser una limitante para este estudio, por lo que se sugiere realizar estudios posteriores de identificación y secuenciación del HVH-6 con cepas virales propias de esta región.

En el grupo de personas sin síntomas o No Sospechosos de infección por HVH-6 la positividad de la qPCR fue del 4% (**Figura 10**), aspecto que puede asociarse a que algunas personas no sintomáticas exhiben ocasionalmente bajas cargas virales de ADN de HVH-6, dato asociado a la alta prevalencia del virus reportada a nivel mundial (hasta 100% en población adulta) y a las personas que son portadores icHVH-6 (Okuno et al., 1989; Pantry & Medveczky, 2017; Per, 2017; Telford, Navarro, &

Santpere, 2018). Adicionalmente, icHVH-6 cursa con una infección persistente de bajo nivel en los tejidos, al estar presente en cada célula nucleada hospedera, afectando la cuantificación de ADN por técnicas de qPCR. Incluso, en la amplificación en muestras de sangre total, las "cargas" de ADN de ciHVH-6 pueden ser significativamente más altas ($>1 \times 10^6$ copias/ml), que en los niños con viremias por infecciones primarias por HVH-6. (Tamae Ohyea, 2016; Tweedy et al., 2016).

Los resultados de laboratorio clínico obtenidos para la prueba IgG de HVH-6 por la técnica de ELISA (**Figura 11**) en todos los participantes, arrojó un porcentaje de positividad del 85%, que se correlaciona bien con lo reportado en la literatura (70-100%) (H Agut et al., 2015; Baillargeon et al., 2000). Este dato es nuevo para el Departamento del Cauca, ya que no existen reportes al respecto. Es conocido que la técnica de ELISA puede presentar reactividad cruzada de anticuerpos entre los distintos miembros de la familia *betaherpesvirus* (CMV, HVH-6, HVH-7), por tal motivo se recomienda para este tipo de estudios realizar pruebas que sean más sensibles y específicas, que eviten los falsos positivos. Además, para poder interpretar la presencia de IgM e IgG de HVH-6 frente a las manifestaciones clínicas, se requiere de un mayor conocimiento de la respuesta inmune humoral contra este virus en las diferentes etapas de su patología (infección primaria, latencia, reactivación e ciHVH-6) (H Agut et al., 2015). Por tanto, las principales indicaciones para los análisis serológicos siguen siendo actualmente el diagnóstico de infección primaria, la identificación de sujetos con/sin HVH-6 y su uso en estudios de seroprevalencia, con la desventaja de que el ELISA no diferencia entre HVH-6A y HVH-6B. No obstante, títulos elevados de anticuerpos anti IgG de HVH-6 se correlacionan bien con infección aguda o reactivación crónica de este virus. (Gutierrez J., 1997; Tomás Pumarola Suñé, 2002). Este aspecto se evidenció en 5 de los Sospechosos, los cuales presentaron la qPCR positiva para HVH-6 y a la vez títulos altos de la IgG contra HVH-6 (>400 UI/ml).

Analizando los resultados obtenidos en la técnica de ELISA versus la qPCR de HVH-6 en el grupo de los Sospechosos, se encontró que un paciente fue negativo (48 AU/ml) para IgG de HVH-6, y su carga viral de ADN fue positiva (10,121 copias/ml), al revisar los datos clínicos se evidenció que el paciente recibió un año antes tratamiento con "Ciclosporina A". Revisando en el vademécum farmacéutico las acciones de la

ciclosporina A, encontramos que es un medicamento conocido por presentar propiedades supresoras de las células del sistema inmune principalmente los linfocitos T y B, al afectarse las células B se disminuye la producción de anticuerpos lo explicaría este hallazgo. (<http://www.iqb.es/cbasicas/farma /farma04/c051.htm>)

El Test de Tzanck fue la técnica que dio significancia estadística entre los Sospechosos y No Sospechosos y también al asociarla con las manifestaciones clínicas como cefalea y depresión ($p < 0.042$), esta es una técnica de primera generación con una sensibilidad aproximada del 70% y fácil de realizar en cualquier laboratorio. Los resultados del TT sumado a los del ELISA de IgG anti HVH-6, corrobora que continúan siendo técnicas de primera opción en nuestro medio para el tamizaje en el diagnóstico de HVH-6, puesto que son económicas y fáciles de realizar. No obstante, este método no permite identificar directamente la infección para el HVH-6, por lo que se hace necesario integrarla con la qPCR de HVH-6. Estos podrán ser implementados como pruebas diagnósticas de rutina para toda clase de patologías infecciosas asociada al HVH-6, apoyando al diagnóstico clínico de una forma más eficaz y confiable.

Clínicamente se clasificaron los signos y síntomas para HVH-6 en cuatro grupos así: Generales (83%), Neurológicos (97%), Fatiga Crónica (93%) y Dermatológicos (87%), siendo más evidentes en la población del Departamento del Cauca las manifestaciones de tipo neurológico y de fatiga crónica (**Tabla 5**), motivo frecuente de consulta médica en la Fundación Julio Klínger en el Departamento del Cauca (Julio C. Klínger, 2005; Sotzny, 2018). Al cruzar los datos obtenidos en las pruebas de laboratorio con las manifestaciones clínicas, se encontró que algunos de los síntomas tenían asociación significativa (**Tabla 6**), entre las que sobresalen síntomas como linfadenitis axilar, malestar post esfuerzo, puntos Rubí, vomito, cefalea y depresión. Debido que el virus presenta tropismo por diferentes tejidos, se presenta diversidad en manifestaciones clínicas.

Una de las intenciones de este estudio era poder encontrar una posible asociación entre las manifestaciones clínicas y la positividad del HVH-6 mediante la técnica de qPCR, para así establecer un posible perfil clínico de la enfermedad provocado por HVH-6. No obstante, debido a la baja positividad de la prueba entre los

Sospechosos, esto hace plantear la necesidad de la búsqueda de la infección en los tejidos específicos y no solamente en sangre periférica. Adicionalmente, se observó que la gran mayoría de los pacientes aquí presentados como Sospechosos recibieron tratamiento con *Valaciclovir* y presentaron mejoría de sus síntomas. Lo que hace suponer que el HVH-6 u otro de los *Bethaherpesvirus* fuera el causante de la enfermedad.

Se espera, que estos datos presentados, contribuyan a un mejor entendimiento de las patologías causadas por el HVH-6 y por los otros herpesvirus, aportando al conocimiento del personal del área de la salud y motive a un diagnóstico oportuno y eficaz (H. Agut et al., 2017; Collin & Flamand, 2017; Szabó, 2017; Yamanishi et al., 1988).

8. CONCLUSIONES

8.1. Por medio de este estudio, queda implementada la técnica de qPCR de HVH-6/5/7/8, para ser puesta al servicio del cuerpo médico y de la comunidad en general, a nivel regional y nacional. Aún queda mucho por conocer acerca de HVH-6 y de los demás *Bethaherpesvirus*, como los mecanismos de integración cromosómica, causas de reactivación, de latencia, mecanismo de producción de enfermedad y los posibles blancos terapéuticos, dejando las puertas abiertas a la investigación en este tema (Gallo, 2006).

8.2. El kit comercial *ARgene*, cuenta con un protocolo de montaje que tiene un alto grado de complejidad en el momento de la adaptación del protocolo al equipo utilizado *QuantStudio 3*. Por lo que se concluye que qPCR a pesar de ser una técnica “fácil, rápida, sensible y específica”, tiene una complejidad mayor y necesita personal entrenado en el área de la biología molecular, además se debe continuar con estudios de estandarización, validación y secuenciación del HVH-6.

8.3. En este trabajo se logró identificar los síntomas clínicos más relevantes para diagnóstico diferencial de HVH-6 en el Departamento del Cauca, clasificándolos en generales, neurológicos, dermatológicos y de fatiga crónica. Esperamos que esto ayude a los clínicos a identificar pertinentemente esta patología y a ofrecer un diagnóstico y tratamiento oportuno a los afectados por HVH-6.

9. RECOMENDACIONES

9.1. El tamaño de muestra se debe incrementar para futuras investigaciones, esto permitirá obtener una asociación estadística con mayor fuerza en el estudio, al correlacionar las cargas virales para HVH-6 con las manifestaciones clínicas y que los resultados sean más concluyentes.

9.2. Continuar con estudios de casos y controles o de cohortes, en los cuales se pueda hacer seguimiento mediante la carga viral para diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes.

9.3. Se sugiere para próximos estudios tener en cuenta otros insumos o marcas de reactivos para mejorar la estandarización de la técnica, la sensibilidad y la especificidad, y conjuntamente trabajar otro tipo de muestras como biopsias, sangre total, LCR y orina.

9.4. Complementar con técnicas de Inmunofluorescencia, PCR de transcriptasa reversa y secuenciación para diferenciar los dos serotipos HVH-6A y HVH-6B y simultáneamente diferenciarlo del HVH-5 y HVH-7 con quienes comparte similitud a nivel genético, epidemiológico y de manifestaciones clínicas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ablashi, D., Agut, H., Alvarez-Lafuente, R., Clark, D. A., Dewhurst, S., DiLuca, D., . . . Yoshikawa, T. (2014). Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Arch Virol*, 159(5), 863-870. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5
- Abnova. (2017). Abnova HHV-6 IgG elisa kit. *Catalog Number KA1457, v9*, 3-13.
- Adam J. Bell, Alice Gallagher, Timothy Mottram, Annette Lake, Eleanor V. Kane, Tracy Lightfoot, Eve Roman, Ruth F. Jarrett. (2014). Germ-Line Transmitted, Chromosomally Integrated HHV-6 and Classical Hodgkin Lymphoma. *PLOS ONE*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0112642.t001
- Agut, H, Bonnafous, & PGautheret-Dejean, A. (2015). Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Clin Microbiol Rev*, 28(2), 313-335. doi: 10.1128/CMR.00122-14
- Agut, H., Bonnafous, P., & Gautheret-Dejean, A. (2017). Update on infections with human herpesviruses 6A, 6B, and 7. [Review]. *Med Mal Infect*, 47(2), 83-91. doi: 10.1016/j.medmal.2016.09.004
- Ahlqvist, Jenny, Fotheringham, Julie, Akhyani, Nahid, Yao, Karen, Fogdell-Hahn, Anna, & Jacobson, Steven. (2005). Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *Journal of neurovirology*, 11(4), 384-394.
- Ahmed M Ashshi, Robert J Cooper, Paul E Klapper, Osama Al-Jiffri, Lynette Moore. (2000). Detection of human herpes virus 6 DNA in fetal hydrops. *THE LANCET* 355, 1519-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02170-X
- Akashi, Koichi, Eizuru, Yoshito, Sumiyoshi, Yoshiaki, Minematsu, Toshio, Hara, Sachiko, Harada, Mine, . . . Minamishima, Yoichi. (1993). Severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *New England Journal of Medicine*, 329(3), 168-171.
- Akhyani, Nahid, Berti, Rossana, Brennan, Meghan B, Soldan, Samantha S, Eaton, Joan M, McFarland, Henry F, & Jacobson, Steven. (2000). Tissue Distribution and Variant Characterization of Human Herpesvirus (HHV)—6: Increased Prevalence of HHV-6A in Patients with Multiple Sclerosis. *The Journal of infectious diseases*, 182(5), 1321-1325.
- al., Loutfy et. (2010). Presence of Human Herpes Virus 6 (HHV6) in pediatric lymphomas: impact on clinical course and association with cytomegalovirus infection. *Virology Journal* 7, 287. doi: 10.1186/1743-422X-7-287
- Álvarez-Lafuente, Roberto, García-Montojo, Marta, De Las Heras, Virginia, Bartolomé, Manuel, & Arroyo, Rafael. (2006). Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing—remitting multiple sclerosis patients. *Journal of Clinical Virology*, 37, S24-S26. doi: 10.1016/s1386-6532(06)70007-5
- Annie Gravel, Isabelle Dubuc, Nina Wallaschek, Shella Gilbert-Girard, Vanessa Collin,, Ruth Hall-Sedlak, Keith R. Jerome, Yasuko Mori, Julie Carbonneau, Guy Boivin,, & Benedikt B. Kaufer, Louis Flamand. (2017). Cell culture systems to study Human Herpesvirus 6A-B ic. *J. Virology*. doi: 10.1128/JVI.00437-17
- Arbuckle, J. H. Medveczky, P. G. (2011). The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Microbes Infect*, 13(8-9), 731-741. doi: 10.1016/j.micinf.2011.03.006
- Arribas Anta, Julia, Zaera de la Fuente, Celia, Graus Morales, Javier, López Durán, Sergio, Cañete Ruiz, Ángel, Gea Rodríguez, Francisco, & Albillos Martínez, Agustín. (2016). Fulminant hepatitis caused by herpes virus 6 in immunocompetent adults.

- Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 39(8), 533-534. doi: 10.1016/j.gastre.2016.07.003
- Asano, Y, Yoshikawa, T, Kajita, Y, Ogura, R, Suga, S, Yazaki, T, . . . Kurata, T. (1992). Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Archives of disease in childhood*, 67(12), 1484-1485.
- Asano, Yoshizo, Yoshikawa, Tetsushi, Suga, Sadao, Yazaki, Takehiko, Kondo, Kazuhiro, & Yamanishi, Koichi. (1990). Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. *The Lancet*, 335(8693), 862-863.
- Baillargeon, Jacques Piper, Jeanna Leach, & T, Charles. (2000). Epidemiology of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection in pregnant and nonpregnant women. *Journal of Clinical Virology*, 16(3), 149-157.
- Bansal A.S., A.S. Bradley, K.N. Bishop, S. Kiani-Alikhan, B. Ford. (2012). Chronic fatigue syndrome, the immune system and viral infection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26, 24-31. doi: 10.1016/j.bbi.2011.06.016
- Becerra-Artiles, A., Santoro, T., & Stern, L. J. (2018). Evaluation of a method to measure HHV-6B infection in vitro based on cell size. *Virology*, 15(1), 4. doi: 10.1186/s12985-017-0917-z
- Becerra, A. Gibson, L. Stern, L. J. Calvo-Calle, J. M. (2014). Immune response to HHV-6 and implications for immunotherapy. []. *Curr Opin Virol*, 9, 154-161. doi: 10.1016/j.coviro.2014.10.001
- Bounaadja, Lotfi, Piret, Jocelyne, Goyette, Nathalie, & Boivin, Guy. (2013). Evaluation of EBV, HHV-6 and HHV-8 Antiviral Drug Susceptibilities Using Real-Time PCR-Based Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM. 03234-03212.
- Breese C., et al. (2008). La integración cromosómica del herpesvirus 6 humano (HHV6) es el principal modo de infección por HHV6 congénita *Pediatrics (Ed esp)* 66(3), 152-159.
- Bressollette-Bodin, C. Nguyen, T. V. Illiaquer, M. Besse, B. Peltier, C. Chevallier, P. Imbert-Marcille, B. M. (2014). Quantification of two viral transcripts by real time PCR to investigate human herpesvirus type 6 active infection. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Virol*, 59(2), 94-99. doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.014
- Bridgette Jeanne Billioux, Emily Leibovitch, Giovanna Brunetto, Irene Dustin, Sara Inati, John Schreiber, Chigo Eze, Kareem Zaghloul Steve Jacobson, William Theodore. (2014). Human Herpes Virus 6 in human epilepsy: Data from surgical resections. *jni journal*, 275 (1-2), 75. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.08.198
- Broccolo, Francesco, Drago, Francesco, Careddu, Anna M, Foglieni, Chiara, Turbino, Laura, Cocuzza, Clementina E, . . . Malnati, Mauro S. (2005). Additional evidence that pityriasis rosea is associated with reactivation of human herpesvirus-6 and-7. *Journal of investigative dermatology*, 124(6), 1234-1240.
- Buchwald, Dedra, Cheney, Paul R, Peterson, Daniel L, Henry, Berch, Wormsley, Susan B, Geiger, Ann, . . . Biddle, Royce. (1992). A chronic illness characterized by fatigue, neurologic and immunologic disorders, and active human herpesvirus type 6 infection. *Annals of internal medicine*, 116(2), 103-113.
- Caroline Breese Hall, MDa, b, Mary T. Caserta, MDa, Kenneth Schnabel, MBAa, Lynne M. Shelley, BSa, Andrea S. Marino, BSa,, & Jennifer A. Carnahan, BSa, Christina Yoo, BSa, Geraldine K. Lofthus, PhDb, y Michael P. McDermott, PhDc. (2008). La integración cromosómica del herpesvirus 6 humano (HHV6) es el principal modo de infección por HHV6 congénita. *Pediatrics (Ed esp)*. 66(3), 152-159.
- Collin, V., & Flamand, L. (2017). HHV-6A/B Integration and the Pathogenesis Associated with the Reactivation of Chromosomally Integrated HHV-6A/B. [Review]. *Viruses*, 9(7). doi: 10.3390/v9070160
- Crawford, J. R., Santi, M. R., Thorarinsdottir, H. K., Cornelison, R., Rushing, E. J., Zhang, H., . . . Macdonald, T. J. (2009). Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric

- brain tumors: association of viral antigen in low grade gliomas. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Virol*, 46(1), 37-42. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.011
- Chan, PKS, Peiris, JSM, Yuen, KY, Liang, RHS, Lau, YL, Chen, FE, . . . Ng, MH. (1997). Human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 infections in bone marrow transplant recipients. *Journal of medical virology*, 53(3), 295-305.
- Chen M., Popescu N., Woodworth C., Z. , Bberneman, M. , Corbellino, P. , Lusso, D. V. , . . . A., Dipaolo J. (1994). Human Herpesvirus 6 Infects Cervical Epithelial Cells and Transactivates Human Papillomavirus Gene Expression. *JOURNAL OF VIROLOGY* 68(2), 1173-1178.
- Chevallier, P. Robillard, N. Illiaquer, M. Esbelin, J. Mohty, M. Bodin-Bressollette, C. Guillaume, T. Stocco, V. Auffray, F. Derenne, S. Planche, L. Bene, M. C. Imbert-Marcille, B. M. (2013). HHV-6 cell receptor CD46 expression on various cell subsets of six blood and graft sources: a prospective series. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Virol*, 56(4), 331-335. doi: 10.1016/j.jcv.2012.12.005
- Chi, J., Gu, B., Zhang, C., Peng, G., Zhou, F., Chen, Y., . . . Yao, K. (2012). Human herpesvirus 6 latent infection in patients with glioma. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Infect Dis*, 206(9), 1394-1398. doi: 10.1093/infdis/jis513
- Chuh, Antonio An Tung, Chan, Henry Hin Lee, Chiu, Susan Shui Seng, Ng, Hoi Yee, & Peiris, Joseph Sriyal Malik. (2002). A prospective case control study of the association of Gianotti–Crosti syndrome with human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections. *Pediatric dermatology*, 19(6), 492-497.
- D., Clark. (2016). Clinical and laboratory features of human herpesvirus 6 chromosomal integration. *Clin Microbiol Infect*, 22, 333-339. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.022
- Dahl H , Linde A, Sundqvis V and Wahren B (1990). An enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to human herpes virus 6. *Journal of Virological Methods*, 29, 313-324.
- Deback C., F. Agbalika, C. Scieux, A.G. Marcelin, A. Gautheret-Dejean, J. Cherot, L. Hermet, O. Roger, H. Agut. (2008). Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene™ kit. *Journal of Virological Methods*, 149, 285-291. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.026
- Dedra Buchwald, Paul R. Cheney, Daniel L. Peterson, Berch Henry, Susan B. Wormsley, Ann Geiger, Dharam V. Ablashi. Zaki Salahuddin, Carl Saxinger, Royce Biddle, Ron Kikinis, Ferenc A. Jolesz, Thomas Folks, Balachandran, James B. Peter, Robert C. Gallo and Anthony L. Komaroff. (1992). A Chronic Illness Characterized by Fatigue, Neurologic and Immunologic Disorders, and Active Human Herpesvirus Type 6 Infection. *Annals of Internal Medicine*, 116(2), 103-113.
- Dewhurst S, McIntyre K, Schabel K and Hall C B. (1993). Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Variant B Accounts for the Majority of Symptomatic Primary HHV-6 Infections in a Population of U.S. Infants. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 416-418.
- Dharam A, Henri A, Roberto Alvarez-Lafuente, Duncan Clark, Stephen Dewhurst, Dario DiLuca, Louis Flamand, Niza Frenkel, Robert Gallo, Ursula Gompels, Per Ho"llsberg, Steven Jacobson, Mario Luppi, Paolo Lusso, Mauro Malnati, Peter Medveczky, Yasuko Mori, Philip E. Pellett, Joshua C. Pritchett, Koichi Yamanishi, Tetsushi Yoshikawa. (2014). Clasificcioin HHV 6 A Y B as distinct viruses. *Arch Virol*, 159, 863-870. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5
- Donati, Donatella, Martinelli, Elena, Cassiani-Ingoni, Riccardo, Ahlqvist, Jenny, Hou, Jean, Major, Eugene O, & Jacobson, Steve. (2005). Variant-specific tropism of human herpesvirus 6 in human astrocytes. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 79(15), 9439-9448.
- Drago, Francesco, Broccolo, Francesco, Ciccacese, Giulia, Rebora, Alfredo, & Parodi, Aurora. (2015). Persistent pityriasis rosea: an unusual form of pityriasis rosea with persistent active HHV-6 and HHV-7 infection. *Dermatology*, 230(1), 23-26.

- Drago, Francesco, Broccolo, Francesco, & Rebora, Alfredo. (2009). Pityriasis rosea: an update with a critical appraisal of its possible herpesviral etiology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61(2), 303-318.
- Dreyfus, DH. (2016). Serological evidence that activation of ubiquitous human herpesvirus-6 (HHV-6) plays a role in chronic idiopathic/spontaneous urticaria (CIU). *Clinical & Experimental Immunology*, 183(2), 230-238.
- Engdahl, Elin. (2016). HUMAN HERPESVIRUS 6A AND 6B: ASSAY VALIDATION, VIRUS-HOST INTERACTION AND CLINICAL RELEVANCE. *Karolinska Institutet*.
- Farr T J, Harnett G B, Pietroboni G R and Bucens M R. (1990). The Distribution of Antibodies to HHV-6 Compared with Other Herpesviruses in Young Children. *Epidemiology and Infection* 105(3), 603-607.
- Fernández, Miguel Guerrero Fernández y José Gutiérrez. (2002). Herpes virus humano tipo 6 y esclerosis múltiple. 1-13.
- Fiebig, U., Holzer, A., Ivanusic, D., Plotzki, E., Hengel, H., Neipel, F., & Denner, J. (2017). Antibody Cross-Reactivity between Porcine Cytomegalovirus (PCMV) and Human Herpesvirus-6 (HHV-6). [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Viruses*, 9(11). doi: 10.3390/v9110317
- Flamand, Benedikt Kaufer and Louis. (2014). Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Current Opinion in Virology*, 9, 111-118. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.010
- Fotheringham, Julie, Williams, Elizabeth L, Akhyani, Nahid, & Jacobson, Steven. (2008). Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 3(2), 105-116.
- Gabriella Campadelli-Fiume, Prisco Mirandola, & Menotti, Laura. (1999). Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (3).
- Gallo, Robert C. (2006). A perspective on human herpes virus 6 (HHV-6). *Journal of Clinical Virology*, 37(1), S3. doi: 10.1016/S1386-6532(06)70003-8
- Gautheret-Dejean, Agnès, & Agut, Henri. (2014). Practical Diagnostic Procedures for HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7 In Irmeli Lautenschlager, Gerhard R. F. Krueger & Dharam V. Ablashi (Eds.), *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7 (Third Edition)* (pp. 9-34). Boston: Elsevier.
- Geraldin A Dominguez, Timothy R. Dambaugh, Felicia R. Stamey, Stephen Dewhurst, Naoki Inoue, And Philip E. Pellett. (1999). Human Herpesvirus 6B Genome Sequence: Coding Content and Comparison with Human Herpesvirus 6A. *JOURNAL OF VIROLOGY* 8040-8052. doi: 0022-538X/99/\$04.0010
- Giuseppe Locatelli, Fabio Santoro, Fabrizio Veglia, Alberto Gobbi, Paolo Lusso and Mauro Malnati (2000). Real-Time Quantitative PCR for Human Herpesvirus 6 DNA. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 38(11), 4042-4048.
- Gutierrez J., M. Rodriguez, IVI. C. Maroto, G. Piedrola and Peiron J. (1997). Behaviour of IgG Antibody Avidity for the Antigen and of IgA Antibody in Active Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Herpes Simplex Virus and Human Herpes Virus 6 Infections, Adaptation of a Commercial Test. *Journal of Infection*, 35, 25-30.
- Hansen, A. S., Bundgaard, B. B., Biltoft, M., Rossen, L. S., & Hollsberg, P. (2017). Divergent tropism of HHV-6AGS and HHV-6BPL1 in T cells expressing different CD46 isoform patterns. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Virology*, 502, 160-170. doi: 10.1016/j.virol.2016.12.027
- Herbein, Georges, Strasswimmer, John, Altieri, Mario, Jaegle, Marie-Lorraine Woehl, Wolf, Philippe, & Obert, Georges. (1996). Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clinical infectious diseases*, 22(1), 171-173.

- Hill, J A, Sedlak, R H, Zerr, D M, Huang, M L, Yeung, C, Myerson, D, . . . Boeckh, M J. (2015). Prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 in patients with human herpesvirus 6-central nervous system dysfunction. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21(2), 371-373. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.09.015
- Hill, J. A., HallSedlak, R., Magaret, A., Huang, M. L., Zerr, D. M., Jerome, K. R., & Boeckh, M. (2016). Efficient identification of inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 using specimen pooling. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Virol*, 77, 71-76. doi: 10.1016/j.jcv.2016.02.016
- Hill, J. A., Sedlak, R. H., & Jerome, K. R. (2014). Past, present, and future perspectives on the diagnosis of Roseolovirus infections. [Review]. *Curr Opin Virol*, 9, 84-90. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.014
- Hudson, A. W. (2014). Roseoloviruses and their modulation of host defenses. [Review]. *Curr Opin Virol*, 9, 178-187. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.009
- Jaskula, E., Dlubek, D., Sedzimirska, M., Duda, D., Tarnowska, A., & Lange, A. (2010). Reactivations of cytomegalovirus, human herpes virus 6, and Epstein-Barr virus differ with respect to risk factors and clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Transplant Proc*, 42(8), 3273-3276. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.027
- Julio C. Klinger, Julián A. Herrera, María L. Díaz, Andrés A. Jhann, Gloria I. Ávila, Clara I. Tobar (2005). La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. *Colombia Medica*, 36(2), 120- 129.
- Karlsson, Teemu, Mannonen, Laura, Loginov, Raisa, Lappalainen, Maija, Höckerstedt, Krister, & Lautenschlager, Irmeli. (2012). Development of a new quantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAemia after liver transplantation. *Journal of Virological Methods*, 181(1), 25-36. doi: https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.007
- Kaufer, B. B., & Flamand, L. (2014). Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Curr Opin Virol*, 9, 111-118. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.010
- Komaroff, Anthony L. (2006). Is human herpesvirus-6 a trigger for chronic fatigue syndrome? *Journal of Clinical Virology*, 37, S39-S46. doi: 10.1016/s1386-6532(06)70010-5
- Kondo, Kazuhiro, Nagafuji, Hiroshi, Hata, Atsuko, Tomomori, Chieri, & Yamanishi, Koichi. (1993). Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *Journal of Infectious Diseases*, 167(5), 1197-1200.
- Kosuge, Haruhiko. (2000). HHV-6, 7 and their related diseases. *Journal of dermatological science*, 22(3), 205-212.
- Krug, L. T., & Pellett, P. E. (2014). Roseolovirus molecular biology: recent advances. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Curr Opin Virol*, 9, 170-177. doi: 10.1016/j.coviro.2014.10.004
- L., Komaroff Anthony. (2006). Is human herpesvirus 6 a trigger for chronic fatigue syndrome. *Journal of Clinical Virology*, 37 Suppl. 1, S39-S46. doi: 10.1016/S1386-6532(06)70010-5
- Laina, Ioanna, Syriopoulou, Vassiliki P, Daikos, George L, Roma, Eleftheria S, Papageorgiou, Foteini, Kakourou, Talia, & Theodoridou, Maria. (2010). Febrile seizures and primary human herpesvirus 6 infection. *Pediatric neurology*, 42(1), 28-31.
- Le Guennec, L., Mokhtari, K., Chauvet, D., Dupuis, N., Roos-Weil, D., Agut, H., . . . Weiss, N. (2017). Human Herpesvirus 6 (HHV-6) necrotizing encephalitis, a rare condition in immunocompromised patients: The importance of brain biopsy associated with HHV-6 testing. [Letter]. *J Neurol Sci*, 377, 112-115. doi: 10.1016/j.jns.2017.04.003
- Leibovitch, Emily C, & Jacobson, Steven. (2015). Human herpesvirus 6 as a viral trigger in mesial temporal lobe epilepsy: Oxford University Press.

- Leveque, Nicolas, Boulagnon, Camille, Brasselet, Camille, Lesaffre, François, Boutolleau, David, Metz, Damien, . . . Andreoletti, Laurent. (2011). A fatal case of Human Herpesvirus 6 chronic myocarditis in an immunocompetent adult. *Journal of Clinical Virology*, 52(2), 142-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.017>
- Ljungman, P, De La Camara, R, Cordonnier, C, Einsele, H, Engelhard, D, Reusser, P, . . . Ward, K. (2008). Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone marrow transplantation*, 42(4), 227.
- Locatelli, Giuseppe, Santoro, Fabio, Veglia, Fabrizio, Gobbi, Alberto, Lusso, Paolo, & Malnati, Mauro S. (2000). Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), 4042-4048.
- Lodi, Giovanni, Scully, Crispian, Carrozzo, Marco, Griffiths, Mark, Sugerman, Philip B, & Thongprasom, Kobkan. (2005). Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 100(1), 40-51.
- Lou, J., Wu, Y., Cai, M., Wu, X., & Shang, S. (2011). Subtype-specific, probe-based, real-time PCR for detection and typing of human herpesvirus-6 encephalitis from pediatric patients under the age of 2 years. [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(2), 223-229. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.002
- Louis, Kaufer Benedikt B and Flamand. (2014). Chromosomally integrated HHV-6, impact on virus, cell and organismal biology. *Current Opinion in Virology* 9, 111-118. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.010
- Loutfy, S. A., Fawzy, M., El-Wakil, M., & Moneer, M. M. (2010). Presence of human herpes virus 6 (HHV6) in pediatric lymphomas: impact on clinical course and association with cytomegalovirus infection. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Viol J*, 7, 287. doi: 10.1186/1743-422X-7-287
- Ma, Xiao-tong, Lu, Dongmei, Song, Yuhua, Mu, G, Ji, L, Li, G, . . . Yang, R. (2000). Relationship between human herpesvirus 6 infection and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Zhonghua xue ye xue za zhi= Zhonghua xueyexue zazhi*, 21(3), 135-137.
- Marcano-Lozada M, Serrano Noris, Urrestarazu María Isabel (2006). Test de Tzanck como herramienta diagnóstica en lesiones de piel. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26, 27-30.
- Marcano-Lozada, MJ, Urrestarazu, MI, & Serrano, N. (2006). El Test de Tzanck como herramienta diagnóstica en lesiones de piel. Estudio preliminar. *Rev Soc Ven Microbiol*, 26, 27-30.
- Maric, Irina, Bryant, Ron, Abu-Asab, Mones, Cohen, Jeffrey I, Vivero, Angelica, Jaffe, Elaine S, . . . Pittaluga, Stefania. (2004). Human herpesvirus-6-associated acute lymphadenitis in immunocompetent adults. *Modern pathology*, 17(11), 1427.
- Matsuda, K., Ohnuma, T., Fukuta, M., Kawai, M., Suzuki, T., Ogawa, H., & Arai, H. (2006). Case reports and literature review: the association between reactivation of human herpes virus-6 and peripheral white blood cell count in patients with carbamazepine-induced hypersensitivity syndrome. [Case Reports Review]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30(4), 751-754. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.01.021
- Mayne, M. , Cheadle, C. , Soldan, S. S. , Cermelli, C. , Yamano, Y. , Akhyani, N. , . . . Jacobson, S. (2001). Gene expression profile of herpesvirus-infected T cells obtained using immunomicroarrays: induction of proinflammatory mechanisms. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Virol*, 75(23), 11641-11650. doi: 10.1128/JVI.75.23.11641-11650.2001

- Millichap, John J, & Millichap, J Gordon. (2015). Role of HHV-6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Pediatric neurology briefs*, 29(5), 40-40.
- Mookerjee, BP, & Vogelsang, G. (1997). Human herpes virus-6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone marrow transplantation*, 20(10), 905.
- Nehal Draz, Sumona Datta, Daniel P Webster, Ian Cropley. (2013). Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome secondary to antituberculosis drugs and associated with human herpes virus-7 (HHV-7). *BMJ Case Rep*, 1-3. doi: 10.1136/bcr-2013010348 10.1136/bcr-2013-010348
- Neuman, M. G., McKinney, K. K., Nanau, R. M., Kong, V., Malkiewicz, I., Mazulli, T., . . . Cohen, L. B. (2013). Drug-induced severe adverse reaction enhanced by human herpes virus-6 reactivation. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Transl Res*, 161(5), 430-440. doi: 10.1016/j.trsl.2012.12.012
- Norton RA1, Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Hocknell P, Dewhurst S. (1999). Detection of human herpesvirus 6 by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.*, 37(11), 3672-3675.
- Nuria Tormo, Carlos Solano, Rafael de la C, amara, Ana Garcia-Noblejas,, Laura Cardenoso, Maria Angeles Clari, Jose Nieto, Javier Lopez,, & Juan Carlos Hernandez-Boluda, Maria Jose Remigia, Isabel Benet, David Navarro. (2010). An Assessment of the Effect of Human Herpesvirus-6 -CMV. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 653-661. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.12.003
- Okuno, TOSHIOMI, Takahashi, KAZUO, Balachandra, KRUVAVON, Shiraki, KIMIYASU, Yamanishi, K, Takahashi, M, & Baba, K. (1989). Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(4), 651-653.
- Pantry, S. N., & Medveczky, P. G. (2017). Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6. [Review]. *Viruses*, 9(7). doi: 10.3390/v9070194
- Peppercorn, Amanda F, Miller, Melissa B, Fitzgerald, David, Weber, David J, Groben, Pamela A, & Cairns, Bruce A. (2010). High-level human herpesvirus-6 viremia associated with onset of Stevens-Johnson syndrome: report of two cases. *Journal of Burn Care & Research*, 31(2), 365-368.
- Per, Ljungman. (2017). Chromosomally integrated HHV-6: a new piece of the puzzle. *BLOOD*, 130(8), 961-962. doi: 10.1182/blood-2017-07-796474 10.1182/blood-2017-06-790410
- Peters, C., & Rabkin, S. D. (2015). Designing Herpes Viruses as Oncolytics. *Mol Ther Oncolytics*, 2. doi: 10.1038/mto.2015.10
- Pritchett, Joshua C., & Ablashi, Dharam V. (2014). Chapter 1 - HHV-6A and HHV-6B Officially Classified as Distinct Viruses *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7 (Third Edition)* (pp. 1-8). Boston: Elsevier.
- R., Saddawi-Konefka Robert & Crawford John. (2010). Chronic Viral Infection and Primary Central Nervous. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 387-403. doi: 10.1007/s11481-010-9204-0
- Reddy, S., Eliassen, E., Krueger, G. R., & Das, B. B. (2017). Human herpesvirus 6-induced inflammatory cardiomyopathy in immunocompetent children. [Review]. *Ann Pediatr Cardiol*, 10(3), 259-268. doi: 10.4103/apc.APC_54_17
- Reddy, S., & Manna, P. (2005). Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(7), 530-541. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.04.010

- Richard Stanton, Julie D. Fox, Richard Caswell, Emma Sherratt and Gavin W. G. Wilkinson. (2002). Analysis of the human herpesvirus-6 immediate-early 1 protein. *Journal of General Virology* 83, 2811-2820.
- Rinaldi, M Perricone, C Ortega-Hernandez, OD Perricone, R Shoenfeld, Y. (2014). Immune thrombocytopenic purpura: an autoimmune cross-link between infections and vaccines. *Lupus*, 23(6), 554-567.
- Saddawi-Konefka, R., & Crawford, J. R. (2010). Chronic viral infection and primary central nervous system malignancy. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5(3), 387-403. doi: 10.1007/s11481-010-9204-0
- Schleiss, David I. Bernstein and Mark R. (1996). The Growing Family of Herpesviridae *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 7(4), 231-237.
- Singh, Nina, & Paterson, David L. (2000). Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation*, 69(12), 2474-2479.
- Sola, Patrizia, Merelli, Elisa, Marasca, Roberto, Poggi, Maria, Luppi, Mario, Montorsi, Marcello, & Torelli, Giuseppe. (1993). Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 56(8), 917-919.
- Soldan, Samantha S, Berti, Rossana, Salem, Nazi, Secchiero, Paola, Flamand, Louis, Calabresi, Peter A, . . . Lin, Hun-Chi. (1997). Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature medicine*, 3(12), 1394-1397.
- Sotzny, Franziska Blanco, Julià Capelli, Enrica Castro-Marrero, Jesús Steiner, Sophie Murovska, Modra Scheibenbogen, Carmen. (2018). Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome – Evidence for an autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.009>
- Strausbaugh, Larry J, Caserta, Mary T, Mock, David J, & Dewhurst, Stephen. (2001). Human herpesvirus 6. *Clinical infectious diseases*, 33(6), 829-833.
- Sumiyoshi, Y, Akashi, K, & Kikuchi, M. (1994). Detection of human herpes virus 6 (HHV 6) in the skin of a patient with primary HHV 6 infection and erythroderma *Clin Pathol*, 47, 762-763.
- Suñé, Tomás Pumarola, Hernández, Natividad Benito, Maeso, María Angeles Marcos, & Camacho, Asunción Moreno. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL HERPES HUMANO TIPO 6.
- Szabó, Dóra. (2017). Emerging viral infections *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(2), 1–26.
- Takagi, Masatoshi, Unno, Atsushi, Maruyama, Takeshi, Kaneko, Kazunari, & Obinata, Kaoru. (1996). Human herpesvirus-6 (HHV-6)-associated hemophagocytic syndrome. *Pediatric hematology and oncology*, 13(5), 451-456.
- Takahashi, K, Sonoda, S, Higashi, Kondo, Kondo, T, Takahashi, H, Takahashi, M, & Yamanishi, K. (1989). Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 63(7), 3161-3163.
- Takemoto, M., Mori, Y., Ueda, K., Kondo, K., & Yamanishi, K. (2004). Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Gen Virol*, 85(Pt 4), 869-879. doi: 10.1099/vir.0.19626-0
- Tamae Ohyea, Yoshiki Kawamura, Hidehito Inagaki, Akiko Yoshikawa, Masaru Ihira, Tetsushi Yoshikawa, Hiroki Kurahashi. (2016). A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated HHV-6. *Journal of Virological Methods*, 228, 74-78. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.001

- Tavakoli, N. P., Nattanmai, S., Hull, R., Fusco, H., Dzigua, L., Wang, H., & Dupuis, M. (2007). Detection and typing of human herpesvirus 6 by molecular methods in specimens from patients diagnosed with encephalitis or meningitis. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Microbiol*, *45*(12), 3972-3978. doi: 10.1128/JCM.01692-07
- Tejada-Simon, Maria V Zang, Ying CQ Hong, Jian Rivera, Victor M Zhang, Jingwu Z. (2003). Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, *53*(2), 189-197.
- Telford, M., Navarro, A., & Santpere, G. (2018). Whole genome diversity of inherited chromosomally integrated HHV-6 derived from healthy individuals of diverse geographic origin. *Sci Rep*, *8*(1), 3472. doi: 10.1038/s41598-018-21645-x
- Tesini, B. L., Epstein, L. G., & Caserta, M. T. (2014). Clinical impact of primary infection with roseoloviruses. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Curr Opin Virol*, *9*, 91-96. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.013
- Theo P. Sloots, John P. Kapeleris, Ian M. Mackay, Marissa Batham, And , & Devine, Peter L. (1996). Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Immunoglobulin G Response to Human Herpesvirus 6. . *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, , 675-679.
- Tokimasa, S, Hara, J, Osugi, Y, Ohta, H, Matsuda, Y, Fujisaki, H, . . . Amou, K. (2002). Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, *29*(7), 595.
- Tomás Pumarola Suñé, Natividad Benito Hernández, María Angeles Marcos y Asunción Moreno Camacho. (2002). DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL HERPES HUMANO TIPO 6. *Control Calidad SEIMC*.
- Tweedy, J., Spyrou, M. A., Pearson, M., Lassner, D., Kuhl, U., & Gompels, U. A. (2016). Complete Genome Sequence of Germline Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6A and Analyses Integration Sites Define a New Human Endogenous Virus with Potential to Reactivate as an Emerging Infection. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Viruses*, *8*(1). doi: 10.3390/v8010019
- V., Gómez-Moreno J. y Cuervas-Mons. (2002). Infección por herpes virus humano-6 y trasplante de órganos. *Rev Clin Esp*, *202*(3), 181-184.
- VanElzakker, M. B. (2013). Chronic fatigue syndrome from vagus nerve infection: a psychoneuroimmunological hypothesis. *Med Hypotheses*, *81*(3), 414-423. doi: 10.1016/j.mehy.2013.05.034
- Wolz, M. M., Sciallis, G. F., & Pittelkow, M. R. (2012). Human herpesviruses 6, 7, and 8 from a dermatologic perspective. [Review]. *Mayo Clin Proc*, *87*(10), 1004-1014. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.04.010
- Y Sumiyoshi, K Akashi, M Kikuchi. (1994). Detection of human herpes virus 6 (HHV 6) in the skin of a patient with primary HHV 6 infection and erythroderma. *J Clin Pathol*, *47*, 762-763.
- Yamanishi, Koichi, Shiraki, Kimiyasu, Kondo, Toshio, Okuno, Toshiomi, Takahashi, Michiaki, Asano, Yoshizo, & Kurata, Takeshi. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *THE LANCET*, *331*(8594), 1065-1067.
- Yip, C. , Sridhar, S., Cheng, A. K. W., Fung, A. M. Y., Cheng, V. C. C., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2017). Comparative evaluation of a laboratory developed real-time PCR assay and the RealStar((R)) HHV-6 PCR Kit for quantitative detection of human herpesvirus 6. [Comparative Study Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Virol Methods*, *246*, 112-116. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.05.001
- YoshikawaTetsushi, Akimoto, Shiho, Nishimura, Naoko, Ozaki, Takao, Ihira, Masaru, Ohashi, Masahiro, . . . Nishiyama, Yukihiro. (2003). Evaluation of active human herpesvirus 6

- infection by reverse transcription -PCR. *J Medical Virology*, Vol. 70,2, 267-272. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.10388>
- Yuki Higashimoto, Akane Ohta, Yukihiro Nishiyama, Masaru Ihira, Ken Sugata, Yoshizo Asano, Daniel L. Peterson, Dharam V. Ablashi, Paolo Lusso, and Tetsushi Yoshikawa. (2016). Development of a Human Herpesvirus 6 Species-Specific Immunoblotting Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1245-1251. doi: 10.1128/JCM.05834-11
- Zerr DM, Corey L, Kim HW e all. (2005). Clinical Outcomes of Human Herpesvirus 6 Reactivation after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7), 932-940.

11. ANEXOS

Anexo 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Investigadores:

Esp. Gloria Inés Ávila (Estudiante de Maestría)
Dr. Julio César Klínger (Director Investigación)
Dra. Rosa Amalia Dueñas Cuellar (Coinvestigadora)
Dra. Victoria Eugenia Niño (Coinvestigadora)

PACIENTES

Están invitados a participar en este proyecto de investigación

60 hombres o mujeres mayores de 18 años residentes permanentes del Departamento del Cauca, 30 que presenten signos de alteraciones dermatológicas, neurológicas y fatiga crónica y 30 controles sanos.

Este formato de consentimiento contiene dos partes:

- a) Hoja de información (para compartir información sobre el estudio con usted)
- b) Certificado de consentimiento (para firmar si usted decide participar)

Se le dará una copia del consentimiento informado

Parte I: Hoja de Información

Introducción

El herpes 6 es un virus que tiene la capacidad de infectar células de la sangre y manifestarse a través de diferentes formas como: erupciones o manchas en la piel, dificultades en el movimiento de extremidades, dolor generalizado, cansancio y alteraciones en el sistema nervioso. Si no se trata adecuadamente, la enfermedad puede ocasionar graves molestias, sentimiento de frustración e incluso ser mortal.

Realizaremos una investigación con las personas que presenten algunos de estos signos y síntomas, les explicaremos en qué consiste el estudio y cómo pueden participar en el proyecto. Si usted desea participar en la investigación puede hacer preguntas en cualquier momento y consultar con su familia o amigos antes de tomar la decisión de formar parte del proyecto.

Propósito de la investigación

Queremos averiguar si las manifestaciones clínicas típicas del herpes 6 coinciden con los resultados obtenidos por medio de pruebas de laboratorio.

Selección de los participantes

Usted está cordialmente invitado a formar parte de este proyecto de investigación por ser mayor de 18 años de edad, pertenecer a esta comunidad y por presentar algunos de las manifestaciones antes mencionadas.

Participación voluntaria y Derecho a rehusar o a retirarse

Usted puede elegir voluntariamente si quiere ser parte del proyecto de investigación o no. En caso de no participar, ninguno de sus servicios de salud a nivel municipal y departamental se verá afectado. Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento si así lo desea. En ese caso, sus muestras serán descartadas.

Procedimientos del estudio:

Si usted presenta alguna de las manifestaciones típicas del herpes 6 se le solicitará:

- Permitir que un médico especialista le realice una valoración física, que podrá incluir algunas preguntas generales sobre usted, su familia y del lugar donde vive.
- Permitir toma de signos vitales.
- Permitir la recolección de muestras de sangre, orina, esputo y/o piel (en caso de presentar lesiones) por personal capacitado.
- Autorizar el almacenamiento del suero de su sangre en refrigeración para futuras investigaciones. Sus datos personales nunca serán revelados.

Le pediremos permiso de tomarle fotografías. Si usted lo autoriza, las fotografías serán usadas solamente para divulgación científica y no serán usadas sin su consentimiento. Las fotografías que identifiquen su rostro quedarán con un velo digital para que usted no pueda ser identificado. Del mismo modo, datos explícitos de su vivienda como dirección o evidencia de la vía, calle o carrera no serán usadas en esta investigación. Si usted no desea que se tomen fotografías, esto no afectará su participación en el proyecto. Los datos y resultados obtenidos no serán usados para discriminación étnica, social, política, religiosa, económica ni de ninguna índole.

Riesgos y molestias

La toma de la muestra de sangre no tiene ningún riesgo, usted sentirá una molestia leve en el momento de la extracción; en caso de necesitar muestra de piel esta se tomará cuidadosamente mediante un raspado en el lugar de la lesión.

Beneficios

La muestra y la información dada por usted nos permitirá detectar la presencia del virus en su organismo a través de métodos científicos avanzados. Los resultados le serán entregados impresos, y de resultar positivos, usted podrá llevarlos a su entidad prestadora de salud con el fin de que le den un tratamiento más específico y combatir sus molestias.

Incentivos

Usted no recibirá ningún incentivo de índole económico (no se le dará dinero) por participar en el estudio, pero se le facilitará la recolección de la muestra en su propia casa o cerca de ella. Los análisis de sangre no tendrán ningún costo y se le entregarán los sus resultados personalmente. También será informado oportunamente en caso de que necesite tratamiento médico.

Confidencialidad

A su información sólo tendrán acceso los miembros del grupo de investigación quienes desarrollarán este proyecto. La información será guardada bajo llave en la oficina de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. Cuando sus datos sean registrados en computador, no incluiremos su nombre sino un código asignado para usted. Sólo el equipo de investigación sabrá cuál es su código único. De este modo, podremos comunicarle si encontramos algo que requiera atención médica. Cuando expliquemos nuestra investigación a otras personas, sólo mostraremos cifras sin indicar personas, es decir, no usaremos su nombre o nada que permita que otras personas sepan quién es usted. Esta investigación contiene los elementos éticos que la ley y la doctrina exigen (código Helsinki-Código Nuremberg resolución 008430 de 1993) y que rigen la ética en la investigación científica en Colombia.

Divulgación de resultados

Una vez toda la información haya sido analizada, los resultados del estudio serán presentados a la comunidad a través de una reunión y usted será invitado a participar. También escribiremos sobre nuestros resultados, de modo que otras personas alrededor del mundo puedan aprender de esta investigación.

¿A quién contactar?

Si tiene preguntas, las puede hacer ahora o luego. Se le dará una copia de este consentimiento escrito. Si tiene preguntas adicionales, por favor contacte a: Dr. Julio César Klínger, Esp. Gloria Inés Ávila, Dra. Rosa Amalia Dueñas Cuellar, o Diana Lorena Mora Obando en el Laboratorio de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. Carrera 6 N° 13N-50 de Popayán, sector de La Estancia. Tel: 8209875 o 82098 00 Ext. 2720.

Esta propuesta ha sido evaluada y aprobada por el Comité de ética de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca-Popayán. Contacto: Helder Mauricio Chacón Villota - Presidente (encargado) Comité de Ética para la Investigación Científica, Teléfono 8209900 Ext. 2633.

Parte II: Certificado de consentimiento informado

PACIENTES

He sido invitado a participar en la investigación sobre el virus herpes 6. Entiendo que se me realizará un examen médico y que se analizará una muestra de mi sangre. He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. Se me ha explicado que mi nombre será codificado para proteger mi identidad, la confidencialidad de los datos y el derecho del anonimato.

Del mismo modo se me ha hecho conocer que los datos y resultados no serán usados para ninguna discriminación étnica, política, social, religiosa, económica ni de ninguna índole y que podré retirarme de la investigación sin previo consentimiento ni con ningún tipo de detrimento para mí. Se me ha explicado que los datos serán usados para análisis y socialización en forma grupal y que no se harán apreciaciones particulares que identifiquen a ningún tipo de participante.

He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Código		
Fecha		
Nombre legible del participante		
Documento de identidad No.		
Firma del participante		

Si el participante no puede escribir: Huella digital

Testigos

He sido testigo de que se leyó exactamente el formulario de consentimiento al participante potencial, y él/ella ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el/la participante ha dado consentimiento libremente.

Nombre

Firma

No. documento

Nombre legible del investigador _____

Firma del investigador _____

Anexo 2. FORMATO DE ENCUESTA

INFORMACIÓN DEL PACIENTE CODIGO: _____

Fecha _____ Fecha y Lugar de nacimiento _____

Documento de identidad _____ Edad (años) _____ Sexo _____

Grupo sanguíneo _____ Afiliación a salud _____ Teléfono _____

Dirección de residencia actual _____

Correo electrónico _____

Ocupación _____ Estrato socioeconómico _____

Estado civil: Soltero _____ Casado _____ Unión estable _____ Otro _____

Escolaridad: Ninguna _____ Primaria _____ Secundaria _____ Técnica _____ Universitaria _____

ANTECEDENTES FAMILIARES:

Algún familiar cercano (padres, hermanos, tíos, primos) ha sufrido alguna enfermedad:

De la cabeza o los nervios. Sí _____ No _____ Cuál _____

Del corazón o presión alta. Sí _____ No _____ Cuál _____

Del pulmón. Sí _____ No _____ Cuál _____

Del estómago o intestino. Sí _____ No _____ Cuál _____

De los riñones. Sí _____ No _____ Cuál _____

Cáncer. Sí _____ No _____ Cuál _____

ANTECEDENTES PERSONALES:

Antecedente de Lactancia Materna Sí _____ No _____

¿Ha estado hospitalizado, bajo tratamiento médico o le han realizado alguna cirugía? _____

¿Cuál? _____

En el último mes, ha tomado algún medicamento Sí _____ No _____ Cuál _____

Se ha realizado prueba para VIH Sí _____ No _____

Ha presentado alguno de los siguientes problemas de salud:

Cáncer. Sí _____ No _____

Diabetes. Sí _____ No _____

Hipertensión. Sí _____ No _____

Hipotiroidismo. Sí _____ No _____

Alergias. Sí _____ No _____ A qué es alérgico _____

Trastornos mentales. Sí _____ No _____ Cuál _____

Mareos, desmayos o convulsiones Sí _____ No _____

Enfermedades del riñón y las vías urinarias Sí _____ No _____

Enfermedades de los ojos Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades de la tiroides Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades del corazón Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades del pulmón Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades del hígado Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades del estómago o intestino Sí _____ No _____ Cuál _____

Enfermedades de la piel Sí ____ No ____ Cuál _____

MANIFESTACIONES CLINICAS

Ha presentado en los últimos seis (6) meses:

- Fiebre. Sí ____ No ____
- Dolor de cabeza. Sí ____ No ____
- Depresión/decaimiento. Sí ____ No ____
- Dolor de garganta. Sí ____ No ____
- Problemas de memoria o concentración. Sí ____ No ____
- Dolor en los nódulos linfáticos cervicales o axilares. Sí ____ No ____
- Dolor muscular. Sí ____ No ____
- Dolor de las articulaciones múltiples. Sí ____ No ____
- Sueño no reparador/alterado. Sí ____ No ____
- Malestar post-esfuerzo. Sí ____ No ____
- Vomito o diarrea. Sí ____ No ____
- Pérdida del apetito. Sí ____ No ____
- Lesiones en piel: Exantema o roséola. Sí ____ No ____
- Vesículas, maculas, pápulas o puntos Rubí. Sí ____ No ____
- Liquen plano. Sí ____ No ____
- Sensaciones extrañas en la piel/hinchazón. Sí ____ No ____
- Pérdida de peso. Sí ____ No ____

Exámenes de laboratorio

- Anticuerpos contra HIV 1/2. Positivo ____ Negativo ____ Otro ____
- LCR: Glucosa ____, Proteínas ____, Células _____
- Hemograma: Hto ____ Hb ____ Leucocitos _____ PMN ____ Linf ____ Mono ____ Baso ____ Plaquetas _____

HALLAZGOS POSITIVOS AL EXÁMEN FÍSICO GENERAL:

Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____ FC: _____ TA: _____
FR: _____ Temperatura: _____

Nombre del Investigador(es) que realizó la encuesta

1. _____

2. _____

Fecha: _____

Lugar y Ciudad: _____

Anexo 3. AVAL COMITÉ DE ETICA



Universidad
del Cauca

Vicerrectoría de Investigaciones

EL COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

CERTIFICA:

Que el proyecto titulado: *"Implementación de métodos moleculares para el diagnóstico del herpes virus humano 6 en pacientes del departamento del Cauca"*, presentado por el doctor Julio César Klinger, docente de la facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca, se ajusta a los requerimientos bioéticos como lo estipula la Resolución 008430 de 1993, del Ministerio de Salud Nacional y teniendo en cuenta que no se trata de un proyecto que contemple ensayos clínicos, se omite el requerimiento establecido en la resolución 2378 de 2008, del Ministerio Nacional de la Protección Social, y en tal virtud no representa riesgos para las personas que participarán en el proyecto de investigación.

El presente proyecto requiere de Consentimiento Informado, de acuerdo con los artículos 15 y 16 de la Resolución 008430 de 1993, del Ministerio de Salud Nacional, el cual fue presentado de conformidad con dicha norma.

Concepto: Proyecto sin riesgo. Aprobado aval ético.

Por lo tanto, se le concedió el aval ético en reunión del Comité de Ética para la Investigación de la Universidad del Cauca, según consta en el acta N° 6 del día 8 de junio de 2016.

Se expide la presente certificación en Popayán, a los veintinueve (29) días del mes de marzo de dos mil diecisiete (2.017).

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Helder'.

HELDER MAURICIO CHACÓN VILLOTA
Secretario Comité de Ética para la Investigación

Helder

Anexo 4. CARTA DE PARTICIPACIÓN DE LA FUNDACIÓN JULIO KLINGER

Popayán 04 de Mayo de 2016



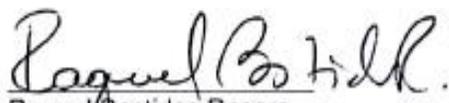
Señores
Universidad del Cauca
Vicerrectoría de Investigaciones
Popayán, Cauca

Asunto: Certificado cofinanciación proyecto Herpes virus humano tipo-6

Apreciados señores,

En mi calidad de representante legal de la Fundación Julio Klinger NIT No. 900.183.862-1, me permito manifestar nuestra intención de participar como cooperadores en el desarrollo del proyecto: "Implementación métodos moleculares para el diagnóstico del Herpes virus humano-6 en pacientes del Departamento del Cauca". En caso de resultar éste aprobado, bajo los términos de referencia y reglamento de la IX Convocatoria de apoyo a proyectos de investigación, desarrollo e innovación, en el marco de maestrías, doctorados y especialidades, Médico Quirúrgicas, la fundación se compromete a aportar los pacientes diagnosticados clínicamente con herpes virus humano tipo-6 (previo consentimiento informado), para que se les realice pruebas moleculares y de laboratorio a fin de confirmar el diagnóstico. En total, el valor de contrapartida en especie de la fundación será el equivalente a la consulta y diagnóstico de 30 pacientes, correspondientes a CUATRO MILLONES, QUINIENTOS MIL PESOS, moneda corriente (\$ 4.500.000).

Cordialmente,



Raquel Bastidas Rosero
Representante legal
Fundación Julio Klinger