

Título: Aportes al conocimiento sobre la patogenia, transmisión y caracterización molecular del VHH8 en Cuba. 2005-2009.

Autores Principales: Pedro Ariel Martínez (arielmr@ipk.sld.cu), Vivian Kourí (vkouri@ipk.sld.cu)

Otros autores: Orestes Blanco , Virginia Capó , María E Rodríguez , María C Dovigny , Narciso Jiménez , Gilberto Fleites , Iraida Caballero, Lidia Cardellá , Yudira Soto , Yoan Alemán , Rosa Ramírez , Betsy Acosta , Mayra Muné , Consuelo Correa , Alina Alvarez , Maika Figueredo , Caridad Luzardo , Angela Gala , Melkis Alfonso , Lissette Pérez , Yaumara Ugarte , Odalys Calderón , Mayda Pérez , Luz M Calderín , Mayda R Font y Ulrich Hengge .

Centro de trabajo: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Premio en la instancia Nacional del Premio Anual de La Salud

RESUMEN

El Sarcoma de Kaposi (SK) fue descrito en 1872 por Moritz Kaposi, a partir de esta descripción inicial se han descrito 4 formas clínico-epidemiológicas: Sarcoma de Kaposi Clásico, Endémico, Iatrogénico y Epidémico o asociado a SIDA. En el año 1994, se descubre un nuevo virus, el Virus del Herpes Humano 8 (VHH8), como el agente causal del Sarcoma de Kaposi (SK). En Cuba, no existían casi reportes de SK antes de la era del SIDA, sin embargo a partir del inicio de la epidemia de SIDA en Cuba se ha incrementado el número de reportes y actualmente existen alrededor de 230 pacientes con diagnóstico de SK, lo que representa cerca del 1,6 % de la población cubana infectada con VIH. A pesar del amplio uso de la terapia con antirretrovirales (ARV), la incidencia de la enfermedad no ha disminuido (1,9% como promedio en los últimos 5 años). La presente investigación pretende profundizar en la patogenia, transmisión y caracterización molecular del VHH8 en pacientes y contactos diagnosticados entre los años 2005-2009. Para ello se normalizó un sistema de PCR en Tiempo real y posteriormente se evaluó y comparó los niveles de carga viral en células y fluidos de 49 pacientes con SK y 22 contactos de pacientes sin evidencias clínicas de enfermedad (asintomáticos), mediante PCR en Tiempo Real para VHH8. Se realizó además la caracterización molecular del VHH8 a partir de 40 muestras de 39 pacientes infectados con el VHH8 con y sin VIH, diagnosticados entre los años 2005-2009, la mayoría de ellos con diagnóstico de SK (35), y otros con enfermedades linfoproliferativas (5). Los resultados de las secuencias obtenidas se compararon con 50 secuencias cubanas obtenidas en años anteriores y se estableció correlación de los hallazgos virológicos con datos demográficos, epidemiológicos y clínicos. Mediante PCR en Tiempo Real se observó que el 98% de los pacientes con SK-SIDA y el 72,7% de los contactos tenían infección con el VHH8. El mayor porcentaje de detección del virus (91,6%) en los pacientes con SK, acompañado de mayores niveles de carga viral se constató en tejido (media del log = 3.14 copias/100 ng ADN) seguido por la saliva y las CMSP, estas dos últimas tanto en pacientes con SK como en individuos asintomáticos infectados, lo que enfatiza la naturaleza sistémica de la infección por el VHH8 e indican el posible papel de la saliva en la transmisión del VHH8. La caracterización molecular confirmó la amplia

variedad de Subtipos de VHH8 que circulan en Cuba, tanto en pacientes con SIDA como en seronegativos a VIH, observándose incremento significativo del subtipo B en los últimos 5 años en relación a los otros subtipos ($p=0.0063$). Se demostró por primera vez en Cuba las secuencias de VHH8 en otras patologías asociadas a procesos linfoproliferativos (3 casos) y 2 Linfomas de Efusión Primarios.

Palabras claves: VHH8, VHH8, Cuba, patogenia, caracterización molecular, transmisión.

INTRODUCCIÓN

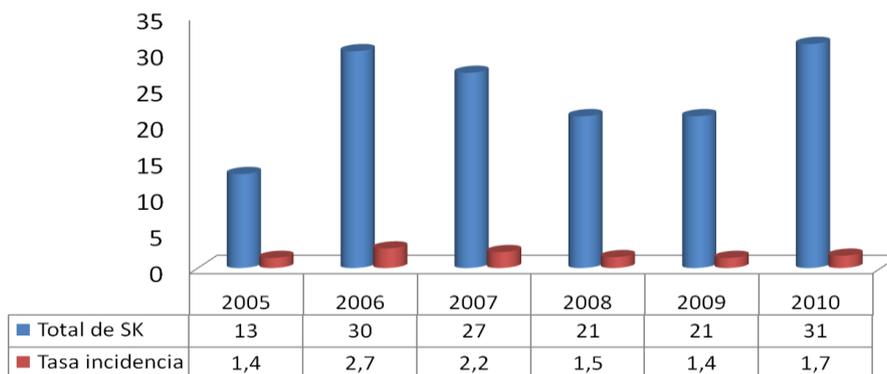
El SK fue descrito por primera vez por Moritz Kaposi en 1872 (forma clásica) como un tumor raro de la piel de origen vascular que aparecía en hombres ancianos de origen mediterráneo o judío. Con posterioridad se describen las variantes endémica o africana y iatrogénica o asociada a trasplante. En la década de los 80, con la aparición de la Epidemia de SIDA, se observa un incremento de este tumor en homosexuales masculinos (SK epidémico), lo cual constituyó uno de los primeros indicadores de la epidemia de SIDA. El SK es 20000 veces más frecuente en afectados de SIDA que en la población general de los Estados Unidos.

La etiología viral de la enfermedad fue sugerida en el año 1994, cuando Chang y Moore identificaron secuencias de ADN de un herpesvirus no conocido hasta este momento en lesiones de SK de pacientes con SIDA; indicando que un nuevo herpesvirus, denominado Virus de Herpes Humano 8 (VHH8) o herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (VHH8) pudiera ser el agente causal de esta enfermedad. Las secuencias virales de este nuevo herpesvirus han sido actualmente reportadas en más del 95% de todas las formas clínicas de SK, además de en otras enfermedades linfoproliferativas como el Linfoma de Efusión Primario (LEP) y la enfermedad multicéntrica de Castleman.

Muchas interrogantes han surgido a partir del conocimiento de este nuevo virus, alrededor de su epidemiología, modo de transmisión y su rol en la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, los estudios de epidemiología molecular han reportado la existencia de cinco genotipos principales (A, B, C, D, E), los cuales parecen estar geográficamente relacionados.

En Cuba, no existían casi reportes de SK antes de la era del SIDA, sin embargo a partir del inicio de la epidemia de SIDA en Cuba en 1986 se ha incrementado el número de casos y actualmente existen alrededor de 230 pacientes con diagnóstico de SK, lo que representa cerca del 1,6 % de la población cubana infectada con VIH. A pesar del amplio uso de la terapia ARV desde el año 2001, la incidencia de la enfermedad no ha disminuido (1,9% como promedio en los últimos 5 años) (Figura 1) .

Figura 1
duran
Fuente: I



VIH-1

Con anterioridad se habían desarrollado varios estudios por nuestro grupo con el fin de conocer la circulación del virus en individuos cubanos con alto y bajo riesgo para la infección por VHH8, así como los subtipos de VHH8 presentes en estos individuos infectados. Este estudio arrojó una baja prevalencia de anticuerpos (Acs) frente a VHH8 en donantes de sangre (1,2%), intermedia en VIH positivos (20,8%) y alta en pacientes con SK (82,2%) y contactos (66,6%). Se detectó además la presencia ADN viral en 97,2% y en el 63,6% del tejido y la saliva, respectivamente de pacientes con SK. Finalmente, la caracterización molecular de pacientes con SK epidémico y contactos infectados demostró la circulación en Cuba de un amplio rango de genotipos, constituyendo el primer reporte de genotipos africanos (B y A5), fuera de este continente.

A pesar de los hallazgos antes mencionados, persisten muchas interrogantes aún sobre la patogenia, las posibles vías de transmisión, la prevalencia en individuos asintomáticos así como la posible relación de determinados subtipos con la transmisión, la evolución y pronóstico de la enfermedad. Por esta razón se han desarrollado una serie de estudios que abordamos en la siguiente investigación y que pretenden profundizar en los aspectos antes mencionados.

OBJETIVOS

Objetivos específicos:

1. Normalizar un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8.
2. Evaluar y comparar el papel de la carga viral de VHH8 en diferentes fluidos y células en pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi y en contactos asintomáticos.
3. Caracterizar molecularmente los VHH8 identificados entre los años 2005-2009 en pacientes cubanos infectados.

DISEÑO METODOLÓGICO

Esta investigación incluye 4 estudios diferentes.

I. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8.

Se normalizó un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) para determinar la carga viral VHH8, en diferentes muestras clínicas de pacientes en los que se sospechó la infección por este agente.

Se evaluaron 3 de los métodos reportados internacionalmente para obtener ADN estándar en la construcción de curvas externas estándar, que permiten determinar el número de copias de ADN diana en la muestra problema. Los 3 métodos utilizados para obtener el estándar fueron: clonaje de un fragmento del gen ORF26 del VHH8 en un vector, productos purificados de PCR de este mismo fragmento y ADN genómico de la línea celular BCBL (BCBL: siglas del inglés *Body Cavity-Based Lymphoma*) que se encuentra infectada de forma latente con el VHH8.

Se determinó el número de copias de cada uno de los estándares obtenidos en equipo el *LightCycler 1.5* (Roche Diagnostic, Alemania). Para la selección del mejor método para determinar la carga viral del VHH8 se tuvieron en cuenta varios parámetros, algunos de ellos se calculan de manera automática por el programa del *LightCycler* (versión 3.3), dentro ellos están: *Pendiente de la curva (Slope)*, *Error*, *Intercepto (Intercept)*, *coeficiente de regresión (r)*.

También se estableció el límite de detección de la PCR-TR normalizada, se identificó la última dilución en la que el sistema fue capaz de detectar el ADN diana en el mismo Cp (punto de corte) para el 100 % de todas las réplicas. Además, para evaluar la especificidad del ensayo y descartar posibles falsos positivos se sometió a amplificación el ADN previamente extraído de 3 cepas: Citomegalovirus humano (CMVh; AD169, ATCC), virus de la varicela zoster (VZV; aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK) y virus del herpes simple 2 (VHS-2, aislamiento clínico, Laboratorio de ITS, Virología, IPK).

II. Cuantificación simultánea de ADN de VHH8 mediante PCR-TR en diferentes células y fluidos de pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi y contactos.

Se realizó un estudio prospectivo de corte transversal, que incluyó dos grupos de estudio, 49 pacientes con SK y 22 contactos (Tabla 1).

Con el objetivo de evaluar y comparar el papel de la carga viral de VHH8 en diferentes compartimentos del organismo en pacientes con SK asociado a SIDA y en contactos de estos pacientes, se empleó PCR-TR previamente normalizado, para determinar el número de copias de VHH8 en muestras de plasma, saliva, tejido y células mononucleares de sangre periférica.

Tabla 1. Muestras clínicas utilizadas para la cuantificación del VHH-8 en pacientes cubanos con SK y contactos.

| Muestras clínicas | SK-SIDA | Contactos | Total |
|-------------------|------------|-----------|------------|
| Plasma | 27 | 22 | 49 |
| Saliva | 41 | 22 | 63 |
| Tejido | 48 | - | 48 |
| CMSP | 26 | 22 | 48 |
| Total | 142 | 66 | 208 |

III. Primer reporte de secuencias de ADN de VHH8 en pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi seronegativos a VIH.

Se realizó un estudio de reporte de casos. Se detectó y cuantificó el VHH8 en 4 pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi, seronegativos a VIH, mediante PCR-TR y posteriormente se secuenció un fragmento de 621 pb (nt 117-738) del

gen ORFK1 de los virus de los pacientes, con el objetivo de determinar el subtipo de VHH8.

IV. Sarcoma de Kaposi y Virus de Herpes Humano 8 en Cuba: Evidencias de expansión del Subtipo B.

Se realizó la caracterización molecular del VHH8 a partir de 40 muestras de 39 pacientes infectados con el VHH8 con y sin VIH, diagnosticados entre los años 2005-2009, la mayoría de ellos con diagnóstico de SK (35), y otros con enfermedades linfoproliferativas (5) asociados a infección con VHH8. Para ello se secuenció un fragmento de 621pb (nt 117-738) del gen ORFK1, que incluye las 2 regiones variables de este gen viral. Los resultados de las secuencias obtenidas se compararon con 50 secuencias cubanas obtenidas en años anteriores y se estableció correlación de los hallazgos virológicos con datos demográficos, epidemiológicos y clínicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8

Se obtuvieron 3 ADN estándar a partir del clonaje de un fragmento del gen ORF26 del herpesvirus humano 8 en un vector (ADN plasmídico), con la utilización de productos purificados de reacción en cadena de la polimerasa y el empleo de ADN genómico de la línea celular BCBL. Se pudieron construir las curvas patrón a partir de cada uno de los ADN estándar obtenidos, los que mostraron una fuerte correlación lineal ($r = -1$) y valores muy bajos de error a lo largo de 6 magnitudes de concentración de ADN diana. El límite inferior de detección a partir del ADN plasmídico y de los productos de reacción en cadena de la polimerasa fue de hasta 100 copias, mientras que con el ADN genómico de la línea celular BCBL fue de hasta 10 copias; por lo que este último sistema resultó el más sensible y el que fue seleccionado para el estudio posterior con las muestras clínicas. La PCR-TR normalizada a partir de los 3 ADN estándar probó ser un sistema rápido, específico y altamente sensible que permitirá un mejor diagnóstico y además desarrollar estudios sobre la patogenia de la infección por el herpesvirus humano 8 en Cuba.

II. Cuantificación simultánea de ADN de VHH8 mediante PCR-TR en diferentes células y fluidos de pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi y contactos.

El 98% de los pacientes con SK presentaban virus detectable. El virus pudo ser detectado en el 91,6% de los tejidos de lesiones de SK mostrando los mayores niveles de carga viral (3.14 copias/100 ng de ADN), seguido por la detección en saliva y CMSP, las que fueron positivas en el 78% y 69,2%, respectivamente. En contraste, el VHH8 sólo fue detectado en 37% de las muestras de plasma, las que también mostraron los menores niveles de carga viral. Los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), tuvieron un riesgo 3 veces más elevado de tener mayor carga viral en tejido comparado con los heterosexuales (HT) (OR3; 95% IC: 1,1-12,5).

Por otro lado, el ADN del VHH8 fue detectado en el 72,7% de los contactos (16/22). Los mayores niveles de carga viral se detectaron en la saliva, seguido por las CMSP (promedio del log copias/100 ng ADN fue de 1,28 y 1,12, respectivamente), mientras que las muestras de plasma mostraron niveles significativamente menores (0,37 log copias/mL). Dos de los 3 contactos intradomiciliarios y 2 de los contactos sexuales serodiscordantes (negativos a VIH) estaban infectados con el VHH8. La detección en saliva y CMSP en HSH fue significativamente superior a las de HT ($p = 0.014$). Los HSH tuvieron mayor posibilidad de tener el virus en saliva cuando se comparan con los individuos HT (OR 4.33; 95% CI 1.117–16.8). No se observaron diferencias significativas entre las cargas virales en las diferentes células y fluidos de pacientes y contactos (Figura 2). La detección del VHH-8 en fluidos orgánicos y células de pacientes con SK-SIDA y contactos asintomáticos resalta la naturaleza sistémica de la infección y confirma el posible papel de la saliva en la transmisión del VHH8. La detección del virus en saliva y CMSP permiten utilizar este sistema como diagnóstico en pacientes asintomáticos.

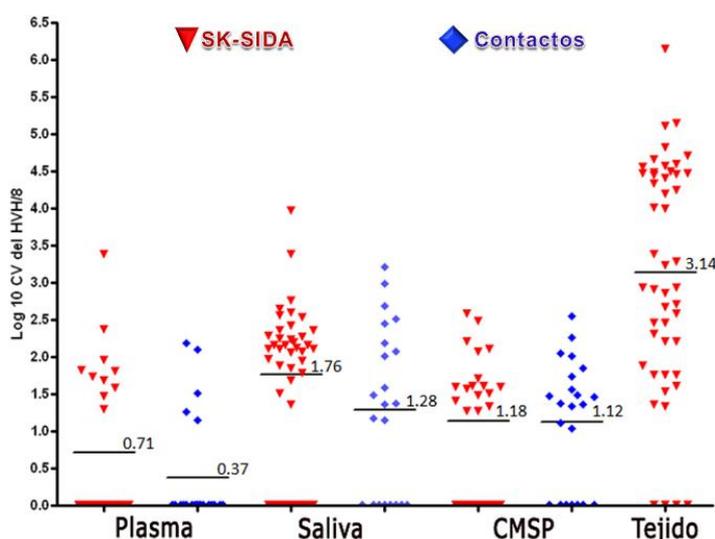


Figura 2. Comparación del Log de CV del VHH-8 en muestras de pacientes con SK-SIDA y Contactos asintomáticos mediante PCR en TR.

III. Primer reporte de secuencias de ADN de VHH8 en pacientes cubanos con Sarcoma de Kaposi seronegativos a VIH.

A pesar de que el SK y la infección por el VHH8 no es frecuente en población cubana seronegativa al VIH, el incremento progresivo de esta patología y la transmisión del virus entre la población de VIH/SIDA, puede incidir en el aumento de la misma en la población general. En este estudio por primera vez se reportan 4 pacientes cubanos con SK, seronegativos al VIH, de los que se obtuvo la secuencia de un fragmento del gen ORF K1 del VHH8, mostrando los datos clínicos y moleculares de los virus de estos pacientes.

De acuerdo a los criterios clínicos y epidemiológicos establecidos, 3 de los pacientes fueron clasificados con SK clásico, sin embargo, uno de los pacientes, se clasificaría como SK no epidémico relacionado a HSH. Este reporte enfatiza la necesidad del sexo seguro, y el probable papel de la saliva

como vía de transmisión. De las 4 secuencias reportadas, 2 pertenecían al subtipo B, una era A y otra era E, reforzando los hallazgos previos de muestras cubanas, donde se observó la gran variedad de subtipos del VHH8 presentes en Cuba, incluidos los genotipos africanos.

IV. Sarcoma de Kaposi y Virus de Herpes Humano 8 en Cuba: Evidencias de expansión del Subtipo B.

La caracterización molecular confirmó la amplia variedad de Subtipos de VHH8 que circulan en Cuba, tanto en pacientes con SIDA como en seronegativos a VIH. De manera general el Subtipo A fue detectado como el más frecuente (40%), seguido por el Subtipo B (24,4%). Los Subtipos C, A5 y E también fueron detectados, pero en menor frecuencia, sin embargo el Subtipo D aún no ha sido reportado en Cuba. Cuando se analizó la variación en la distribución de los subtipos de VHH8 entre los años 1991 al 2009, se observó, que a pesar de que los diferentes subtipos virales estuvieron presentes desde el inicio de la epidemia de VIH, el Subtipo A ha ido disminuyendo progresivamente a expensas de un aumento del Subtipo B que se ha incrementado significativamente en los últimos 5 años en relación a los otros subtipos ($p=0.0063$), lo que pudiera deberse a una mejor adaptación de esta variante viral resultando en una transmisión más eficiente o a cambios en los patrones de conducta sexual de los pacientes infectados con el Subtipo B del VHH8. Se reportan además por primera vez en Cuba las secuencias de VHH8 en otras patologías asociadas a procesos linfoproliferativos (3 casos) y 2 Linfomas de Efusión Primarios.

CONCLUSIONES

-  Se introduce el diagnóstico por PCR en Tiempo Real del VHH-8 en Cuba, técnica altamente sensible y específica para la cuantificación del virus.
-  Se aportan nuevas evidencias que confirman la naturaleza sistémica de la infección por VHH8 y las vías de transmisión.
-  Se evidencia que existe una elevada transmisibilidad del virus en contactos de pacientes con SK, incluso en seronegativos al VIH.
-  La detección en saliva y CMSP, representan muestras potenciales para diagnóstico en individuos infectados de manera asintomática.
-  Primer reporte en Cuba de confirmación y tipificación molecular de VHH-8 en pacientes seronegativos a VIH.
-  Se confirma la gran variedad de subtipos de VHH8 que circulan en Cuba observándose un aumento significativo en la detección del Subtipo B.
-  Se reportan por primera vez en Cuba casos con Linfoma de Efusión Primaria y con otras patologías linfoproliferativas asociadas a infección con VHH8.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablashi, D.V., Chatlynne, L.G., Whitman, J.E., Jr., Cesarman, E., 2002. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clinical microbiology reviews* 15, 439-464.
- Biggar, R.J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A.C., Black, F., 2000. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *The Journal of infectious diseases* 181, 1562-1568.
- Boshoff, C., Weiss, R.A., 2001. Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356, 517-534.
- Cassar, O., Blondot, M.L., Mohanna, S., Jouvion, G., Bravo, F., Maco, V., Duprez, R., Huerre, M., Gotuzzo, E., Gessain, A., 2010. Human herpesvirus 8 genotype E in patients with Kaposi sarcoma, Peru. *Emerging infectious diseases* 16, 1459-1462.
- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W., Knowles, D.M., 1995. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *The New England journal of medicine* 332, 1186-1191.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., Moore, P.S., 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865-1869.
- Hayward, G.S., Zong, J.C., 2007. Modern evolutionary history of the human KSHV genome. *Current topics in microbiology and immunology* 312, 1-42.
- Iversen, O.H., Wetteland, P., Jervell, J.A., Westlie, L.O., 1980. Kaposi's sarcoma in a renal allograft recipient under longterm immunosuppressive therapy. *Scandinavian journal of urology and nephrology* 14, 125-128.
- Kasolo, F.C., Spinks, J., Bima, H., Bates, M., Gompels, U.A., 2007. Diverse genotypes of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) identified in infant blood infections in African childhood-KS and HIV/AIDS endemic region. *Journal of medical virology* 79, 1555-1561.
- Kouri, V., Eng, S.M., Rodriguez, M.E., Resik, S., Orraca, O., Moore, P.S., Chang, Y., 2004. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in various populations in Cuba. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health* 15, 320-325.
- Kouri, V., Liang, X., Rodriguez, M.E., Capo, V., Resik, S., Barrios, J., Mantecon, B., Blanco, O., Means, R., Jung, J.U., Lee, B.S., Hengge, U.R., 2005a. Molecular epidemiology and KSHV K1 subtypes in a Cuban AIDS-Kaposi's sarcoma population. *AIDS* 19, 984-987.
- Kouri, V., Marini, A., Doroudi, R., Nambiar, S., Rodriguez, M.E., Capo, V., Resik, S., Blanco, O., Martinez, A., Hengge, U.R., 2005b. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) in Cuban and German patients with Kaposi's sarcoma (KS) and asymptomatic sexual contacts. *Virology* 337, 297-303.
- Lacoste, V., Judde, J.G., Briere, J., Tulliez, M., Garin, B., Kassa-Kelembho, E., Morvan, J., Couppie, P., Clyti, E., Forteza Vila, J., Rio, B., Delmer, A., Mauclere, P., Gessain, A., 2000. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in africa:

both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14.1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology* 278, 60-74.

- Larionov, A., Krause, A., Miller, W., 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 6,62.
- Mohanna, S., Maco, V., Bravo, F., Gotuzzo, E., 2005. Epidemiology and clinical characteristics of classic Kaposi's sarcoma, seroprevalence, and variants of human herpesvirus 8 in South America: a critical review of an old disease. *IJID* 9, 239-250.
- Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla, CA, USA: IUL, p. 1-20.
- Sunil, M., Reid, E., Lechowicz, M.J., 2010. Update on HHV-8-Associated Malignancies. *Current infectious disease reports* 12, 147-154.
- Thomas, S., Sindhu, C.B., Sreekumar, S., Sasidharan, P.K., 2011. AIDS associated Kaposi's sarcoma. *The Journal of the Association of Physicians of India* 59, 387-389.
- Uldrick, T.S., Whitby, D., 2011. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer letters* 305, 150-162.
- Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T., 2006. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med* 27,254-98.
- Yun, J.J., Heisler, L.E., Hwang, I.I., Wilkins, O., Lau, S.K., Hycza, M., et al., 2006. Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 34, 85.
- Zong, J.C., Ciufu, D.M., Alcendor, D.J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P.J., Rady, P.L., Tyring, S.K., Orenstein, J.M., Rabkin, C.S., Su, I.J., Powell, K.F., Croxson, M., Foreman, K.E., Nickoloff, B.J., Alkan, S., Hayward, G.S., 1999. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *Journal of virology* 73, 4156-4170.
- Zong, J.C., Kajumbula, H., Boto, W., Hayward, G.S., 2007. Evaluation of global clustering patterns and strain variation over an extended ORF26 gene locus from Kaposi's sarcoma herpesvirus. *Virology* 40, 19-25.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS QUE AVALAN EL RESULTADO

1. Kourí V, Martínez PA, Acosta B, Rodríguez ME, Blanco O, Capó V, González RL, Viera J, Hengge U. First report of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA sequences from Cuban KS patients without HIV infection. *AIDS* 2007; 21:2113-2115.
2. Martínez PA; Muné M; Soto Y; Ramírez R; Correa C; Alfonso M; Kourí V. Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8. *Rev Cub Med Trop.* 2009; 61 (2).
3. PA. Martínez, V. Kouri, Y. Aleman, O. Blanco, V. Capó, M.E. Rodríguez, M. Dovigny, L. Cardellá, A. Gala, N. Jiménez, C. Luzardo, C. Correa, L. Pérez, A. Alvarez, U. Hengge. High diversity of HHV-8 molecular subtypes in AIDS-KS Cuban individuals and its relation with HHV-8 load: evidence of subtype B expansion. *Clin Microb and Infect.* 2010; 61 (2): S335.

4. Kourí V, Martínez PA, Blanco O, Capó V, Rodríguez ME, Dovigny MC, Cardella´ L, Gala A, Jiménez NA, Luzardo C, Correa C, Alemán Y, Pérez L, Álvarez A, Hengge U. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus load in asymptomatic contacts of Cuban epidemic KS patients. **Arch Virol.** 2010; 155(12):1971-1976.
5. Kourí V, Martínez PA, Blanco O, Capó V, Rodríguez ME, Dovigny MC, Cardella´ L, Gala A, Jiménez NA, Luzardo C, Correa C, Alemán Y, Pérez L, Álvarez A, Hengge U. Simultaneous quantification of Human Herpesvirus 8 by real-time PCR in different tissues of AIDS Cuban patients with Kaposi's sarcoma. **Herpesviridae** 2010.1;3.