

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Cirugía

Factores clínicos y  
biológicos asociados a la  
infección por el virus de  
Epstein-Barr en niños  
expuestos no infectados al  
Virus de la  
Inmunodeficiencia Humana

TESIS DOCTORAL

2020

---

**Ana Montoya Ferrer**

**Director:**

**Miguel de Górgolas Hernández-Mora MD, PhD**

**Co-director:**

**Edouard Tuillon MD, PhD**

**AUTÓNOMA UNIVERSITY OF MADRID**



**Faculty of Medicine**

**Department of Medicine and Surgery**

Clinical and Biological  
Factors Associated With  
Early  
Epstein-Barr Virus  
Infection in Human  
Immunodeficiency Virus–  
Exposed Uninfected Infants

**DOCTORAL THESIS**

**2020**

---

**Ana Montoya Ferrer**

**Director:**

**Miguel de Górgolas Hernández-Mora MD, PhD**

**Co-Director:**


**Edouard Tuaille MD, PhD**

**DR. MIGUEL DE GÓRGOLAS HERNÁNDEZ-MORA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE ASOCIADO DEL SERVICIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DIAZ**

**CERTIFICA QUE:**

El trabajo de investigación presentado por **Dña. Ana Montoya Ferrer**, titulado “Factores clínicos y biológicos asociados a la infección por el virus de Epstein-Barr en niños expuestos no infectados al Virus de la Inmunodeficiencia Humana” realizado bajo mi dirección, reúne los requisitos científicos, metodológicos y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que surta los efectos oportunos, se firma la presente en Madrid a uno de octubre de 2020.



Dr. Miguel de Górgolas Hernández-Mora

---

## **Dedicatoria**

*A mi familia*

*A mis padres y hermanas, por su apoyo incondicional*

*A Jorge, por la fuerza y coraje*

*A Vera, Sabina y Mireia, mis tres luceros*

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr Miguel de Górgolas Hernández-Mora, mi director de tesis, por su apoyo y dedicación durante todos estos años, especialmente en este último período, tan complicado para todos. Muchas gracias por estar presente Miguel y apoyarme a pesar de las dificultades y la distancia.

Je suis obligée de bien changer la langue, parce que le Pr Édouard Tuillon, co-directeur de cette thèse en France, bien mérite s'en passer sans le Google translate cette fois ci. J'ai que des mots de remerciements et gratitude parce que cette thèse n'aurais jamais abouti sans ton énorme investissement. Merci par ton dévouement, ta patience (il le faut pour comprendre mon français...) mais surtout pour tout le savoir que tu m'a trasmisse au long de tous ces années. Mais au-delà de la science, c'est la amitié. Je pensais que les françaises c'était autre chose... mais voilà Édouard.

Je voudrais remercier a toute l'ensemble de la Unité INSERM 1058, spécialement au Pr Philippe Van de Perre, pour m'avoir accueilli et permis de travailler avec une équipe de ce niveau scientifique, et aussi le Pr Nicolas Nagot. Merci au Pr Jean Pierre Moles, qui a été toujours disponible et m'a aidé aussi avec énorme patiente dans des difficiles tâches (cette congélateur...) et bien au-delà. Merci aux statisticiennes, Marianne et Roselyne, pour votre infinie patiente et aide inestimable.

Et encore en français, au Dr Armen Sanyosan, ça a été un énorme plaisir d'avoir travaillé avec toi et avoir pu compter sur ton aide. Sans toi, j'aurais pas pu accomplir ce dure travail. Je n'oublie pas tous les stagiaires qui nous ont aidés pendant tous ces années, spécialement Alexis. Tant aussi important, Amandine, je n'aurais jamais pu imaginer que j'allais apprendre à utiliser un méthode de dilution en cascade... et aussi Karine.

Tous mes remerciements à toute l'équipe du Service de Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital universitaire de Montpellier, spécialement le Pr Reynes, qui m'a donné l'opportunité il y a déjà 7 ans de travailler dans son département, et renouvelé sa confiance pendant tout ce temps là.

Muchas gracias al Profesor Manuel Fernández Guerrero, por tener fe en mí, y demostrármelo tantas veces durante todos mis años dentro y fuera de la Concha. Y al Profesor Joaquín García Cañete, por su calidad humana y profesional, de las que tanto aprendí durante mis años en la Concha.

Muchas gracias a todas mis amigas, Lara, Marta, Laura, Angela, Gemma y Emma. Han sido años difíciles para mí, y a pesar de mi ausencia, vosotras siempre habéis estado ahí para apoyarme. Y a Paloma, por haberme acompañado en esta travesía tan dura y grata al mismo tiempo. Y muchas gracias a Marta y Dominik, Marie Laure et Nicolas, Pilar y Fran, tengo mucha suerte de haber podido contar con vuestra amistad y apoyo logístico (imprescindible!) durante todos estos años.

# INDICE

<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>15</b>
<b>II. OVERALL THESIS ABSTRACT .....</b>	<b>17</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>A. VIRUS DE EPSTEIN-BARR.....</b>	<b>19</b>
1. VIROLOGÍA.....	19
a) Generalidades.....	19
b) Estructura y ciclo viral.....	22
c) Genoma viral y programas de latencia .....	23
d) Ciclo replicativo. Teoría del centro germinal .....	28
e) Respuesta inmune .....	31
2. VÍAS DE TRASMISIÓN .....	35
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	37
4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	39
a) Primoinfección.....	40
b) Tumores relacionados con el VEB .....	41
c) Enfermedades autoinmunes .....	53
<b>B. NIÑOS EXPUESTOS NO INFECTADOS POR EL VIH.....</b>	<b>56</b>
1. TRASMISIÓN PRECOZ DEL VEB Y VIH.....	58
2. TRASMISIÓN PRECOZ DEL VEB Y MALARIA .....	60
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>A. HIPÓTESIS.....</b>	<b>63</b>
1. Hipótesis conceptual.....	63
2. Hipótesis operativa. ....	63

<b>B. OBJETIVOS .....</b>	<b>64</b>
1. Objetivo principal .....	64
2. Objetivos secundarios.....	64
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>A. DISEÑO.....</b>	<b>67</b>
1. Estudio ANRS 12174 .....	67
2. Consideraciones éticas.....	68
3. Ámbito del estudio.....	69
4. Epidemiología del VIH en Uganda.....	70
5. Epidemiología de la malaria en Uganda.....	71
<b>B. SELECCIÓN DE LA COHORTE.....</b>	<b>73</b>
1. Criterios de inclusión.....	73
2. Criterios de exclusión: .....	73
<b>C. MATERIALES .....</b>	<b>74</b>
<b>D. MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
1. Diagnóstico de la infección por el VEB en los niños a la semana 50 .....	75
a) Validación de la serología del VEB en muestras DBS.....	76
b) Trasferencia de anticuerpos maternos.....	78
2. Cuantificación del ADN del VEB en muestras DBS de niños y plasma/leche materna .....	78
3. Exposición a la malaria.....	79
4. Evaluación clínica y eventos adversos graves.....	80
<b>E. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>81</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>A. Selección de las parejas madre-niño incluidas en el estudio.....</b>	<b>83</b>
<b>B. Características basales de las parejas madre-niño incluidas .....</b>	<b>85</b>
<b>C. Prevalencia de la infección por el VEB al año de vida.....</b>	<b>86</b>



<b>D. Presencia de ADN del VEB en muestras de leche y plasma maternos.....</b>	<b>88</b>
<b>E. Traslencia de anticuerpos IgG anti-VCA vía trasplacentaria .....</b>	<b>93</b>
<b>F. Exposición al paludismo .....</b>	<b>94</b>
<b>G. Eventos adversos graves.....</b>	<b>94</b>
<b>H. Análisis univariado y multivariado de los factores maternos e infantiles asociados a la infección por el VEB en el primer año de vida .....</b>	<b>96</b>
<b>I. Factores asociados con una carga viral elevada del VEB en los niños.....</b>	<b>100</b>
<b>J. Infección por el VEB y crecimiento al año de vida .....</b>	<b>104</b>
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
<b>A. Factores asociados a la infección por el VEB.....</b>	<b>108</b>
1. <i>Shedding</i> del VEB en leche y plasma materna.....	108
2. Variables sociodemográficas.....	112
3. Protección de los anticuerpos IgG anti-VCA maternos.....	113
<b>B. Prevalencia de la infección al año de vida .....</b>	<b>116</b>
<b>C. Determinantes del control de la infección por el VEB en los niños.....</b>	<b>120</b>
1. Enfermedades intercurrentes .....	120
2. Paludismo y precocidad de la infección por el VEB.....	122
3. Profilaxis antiretroviral.....	124
<b>D. Manifestaciones clínicas y crecimiento .....</b>	<b>125</b>
1. Crecimiento .....	125
2. Consecuencias clínicas a corto y largo plazo .....	127
a) Consecuencias clínicas a corto plazo.....	127
b) Consecuencias a largo plazo.....	129
<b>E. LIMITACIONES .....</b>	<b>132</b>
<b>F. FORTALEZAS .....</b>	<b>133</b>

G. PERSPECTIVAS.....	134
<b>VIII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>IX. CONCLUSIONS.....</b>	<b>139</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>141</b>
<b>XI. TABLAS.....</b>	<b>165</b>
<b>XII. FIGURAS .....</b>	<b>167</b>
<b>XIII. ABREVIATURAS.....</b>	<b>169</b>
<b>XIV. APÉNDICES .....</b>	<b>171</b>

## I. RESUMEN

El número de niños expuestos pero no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (*HIV exposed uninfected*, HEU) aumenta progresivamente gracias a la eficacia de los programas de prevención de la transmisión madre-hijo del VIH. Sin embargo, los niños HEU están frecuentemente expuestos a numerosos patógenos durante el período perinatal, y el riesgo de morbimortalidad de origen infeccioso está aumentado con respecto a los niños nacidos de madres sanas.

En este trabajo de tesis nos interesamos por el estudio de la transmisión postnatal de un virus en particular, el virus de Epstein-Barr (VEB), en un grupo de niños africanos HEU que recibieron lactancia natural durante el primer año de vida. Nuestro objetivo consiste en identificar los factores maternos e infantiles implicados en la adquisición y control de la infección por el VEB en los niños, entre ellos, la exposición viral a través de la leche materna.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la infección por el VEB es frecuente en los niños HEU y está asociada al estatus inmunoviológico de la madre y a la presencia del VEB en la leche materna. A su vez, observamos que los niveles del VEB en sangre son mayores en niños que sufren enfermedades intercurrentes y que la presencia de diversas comorbilidades, incluida la infección por el VEB, produce alteraciones en el crecimiento de los niños al año de vida.

Esta tesis nos ayuda a comprender los mecanismos implicados en el control de la infección por el VEB en las madres que viven con el VIH. La exposición del VEB a través de la leche materna, podría considerarse como un marcador del estatus inmunoviológico de la madre, e igualmente del riesgo de la transmisión madre-hijo del VEB. La infección por el VEB puede constituir un elemento agresor adicional durante la primera etapa de la vida, y

conjuntamente con el resto de comorbilidades, tener consecuencias en la salud y el crecimiento de los niños HEU.

## II. OVERALL THESIS ABSTRACT

The number of human immunodeficiency virus (HIV) exposed uninfected (HEU) infants is progressively increasing thanks to the effectiveness of the prevention programs of mother-to-child transmission (PMTCT) of HIV. However, HEU infants are frequently exposed to numerous pathogens during the perinatal period, and the risk of morbidity and mortality of infectious origin is increased compared to children born to healthy mothers.

In this thesis work we study the postnatal transmission of a particular virus, the Epstein-Barr virus (EBV) in a group of HEU children of African origin who were breastfed during the first year of life. Our objective is to identify the maternal and infant factors involved in the acquisition and control of EBV infection during the postnatal period, including the viral exposition through breast milk.

The results of this study show that EBV infection is frequent in HEU children and is associated with the mother's immunovirological status and the presence of EBV in breast milk. In turn, we observed that EBV DNA levels were higher among infants with intercurrent illnesses and that the presence of various comorbidities, including EBV infection, impaired infant growth at one year.

This thesis helps us to understand the mechanisms involved in the control of EBV infection in mothers living with HIV. Exposure to EBV through breast milk could be considered as a marker of the mother's immunovirological status, as well as a risk factor of mother to child transmission of EBV. EBV infection could be significant for the health of HEU during their first stage of life, and together with the rest of comorbidities, might negatively affect infant growth.

### III. INTRODUCCIÓN

#### A. VIRUS DE EPSTEIN-BARR

##### 1. VIROLOGÍA

##### a) Generalidades

El virus de Epstein-Barr o herpes virus humano 4 (VEB o HHV-4) pertenece a la familia de los herpesvirus, subfamilia gammaherpesviridae (Roizman et al., 1981). La peculiaridad de esta subfamilia, a la que también pertenece el herpes virus humano 8 (HHV-8) o virus del sarcoma de Kaposi, consiste en su capacidad de infectar y replicarse en las células linfoides. El VEB es capaz de transformar *in vitro* las células B en reposo en blastos proliferativos, generando un crecimiento incontrolado (Diehl et al., 1968).

El VEB es un virus extremadamente bien adaptado al hombre, que infecta de forma silente a prácticamente la totalidad de la población adulta (Bellows et al., 2002; Young and Rickinson, 2004). El VEB ha coevolucionado con la especie humana durante millones de años (Grose and Johanson, 2016) y posee grandes similitudes genéticas con otros virus más antiguos, hallados en primates no humanos del viejo mundo (virus de los monos rhesus o chimpancés) (Moghaddam et al., 1997; Wang, 2013). Al igual que estos virus, el VEB posee un tropismo linfoepitelial y la capacidad de producir una infección crónica latente en los linfocitos B.

Se conocen dos subtipos del VEB, el tipo 1 y el 2 (tipo A o tipo B), en base a la secuencia de nucleótidos de sus proteínas latentes: antígeno nuclear 2 del VEB (*nuclear antigen*, EBNA-2), antígeno nuclear 3 (EBNA-3) y proteína líder (*leader protein*, EBNA-LP) (Yamanishi, 2007). El VEB tipo 1 es el más frecuente y el subtipo mayoritario en la población caucásica y del sudeste asiático (80-90%). El VEB tipo 2 se distribuye en similar proporción

que el tipo 1 en África y Nueva Guinea (Young et al., 1987). La coinfección entre ambos serotipos es posible y es más frecuente entre las personas que viven con el VIH (PVV) (Coleman et al., 2017; Petrara et al., 2014) Estos dos serotipos difieren no sólo en su distribución geográfica sino también en su capacidad de transformar el linfocito B, siendo más eficiente el tipo 1 (Rickinson et al., 1987; Tzellos et al., 2014; Coleman et al., 2017)

El VEB fue descubierto por Denis Burkitt, un cirujano irlandés que trabajaba en Uganda y que a finales de los años 50, describe por primera vez el tumor que será conocido posteriormente como Linfoma Burkitt (LB). Este tumor afectaba típicamente a los niños y se caracterizaba por la aparición de grandes adenopatías en la región cervical (Epstein et al., 1964). Gracias a la colaboración con el virólogo inglés Anthony Epstein y su estudiante Yvonne Barr, el VEB se aisló por primera vez en muestras histológicas de LB en 1964 (EPSTEIN et al., 1964). El VEB fue el primer virus detectado en células humanas cancerígenas y fue el primer oncovirus reconocido por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) - que forma parte de la Organización Mundial de la salud (OMS)- como agente carcinogénico del grupo 1 ("IARC Monographs – disponible en formato PDF" n.d.; Perera et al., 2010). Poco después, en 1966, el VEB se identificó como agente causal de la mononucleosis infecciosa, entidad que había sido ya caracterizada en los años 20 (Jenson, 2006; Rickinson et al., 1987; Roizman 2013). La Tabla 1 representa algunos de los hitos históricos en la investigación acerca del VEB.

## INTRODUCCIÓN

<b>Año</b>	<b>Científicos implicados</b>	<b>Descubrimiento</b>
1958	Denis Burkitt (Burkitt, 1962)	Linfoma Burkitt
1964	Antony Epstein, Yvonne Barr (Epstein, 2012)	Aislamiento del VEB
1966- 1970	Gertrude and Werner Henle; George Klein (Moss and Lutzky, 2015)	Anticuerpos contra el VEB detectados por inmunofluorescencia
1967	Gertrude and Werner Henle (Bernard Roizman, 2013)	VEB como causa de la mononucleosis infecciosa
1970	Herald zur Hausen (zur Hausen et al., 1970)	VEB en células de carcinoma nasofaríngeo
1971	John Pope, Denis Moss (Pope et al., 1968)	EBV transforma células B in vitro
1973	George Miller (Miller and Lipman, 1973)	Producción de viriones en líneas celulares B95.8
1978	Guy de-The (de-Thé et al., 1978)	Infección precoz por el VEB y Linfoma Burkitt endémico
1980	C.V. Sumaya (Sumaya et al., 1980)	El papel del VEB en la esclerosis múltiple
1982	John Ziegler (Ziegler et al., 1982)	VEB en el Linfoma Burkitt asociado al SIDA
1984	R. Baer (Baer et al., 1984)	Secuencia del genoma del VEB
1988	James Jones (Jones et al., 1988)	VEB y linfoma T
1989	Nancy Mueller (Mueller et al., 1989)	VEB y Linfoma Hodgkin
1991	Eithne MacMahon (MacMahon et al., 1991)	VEB y Linfoma primario del SNC asociado a SIDA
1991	Anne K. Junker (Junker et al., 1991)	ADN del VEB en leche materna
2000	David A. Thorley-Lawson (Babcock et al., 2000)	Modelo del "centro Germinal" de la infección del VEB
2001	Malin Enbom (Enbom et al., 2001)	ADN del VEB en secreciones cervicales

**Tabla 1. Hitos históricos en la investigación del Virus de Epstein-Barr**



b) Estructura y ciclo viral

El VEB posee una arquitectura común y un ciclo viral similar al resto de virus de la familia herpesvirus, caracterizado por una infección crónica latente y reactivaciones periódicas. Durante las reactivaciones, el virus se replica de forma activa (infección lítica) con la consiguiente formación de viriones, destrucción de la célula infectada y transmisión (Young and Rickinson, 2004; Roizman 2013;).

El VEB consta de una doble cadena lineal de ácido desoxiribonucleico (ADN) recubierta por una cápside icosaédrica, formada por 162 capsómeros y envuelta por un magma proteico o tegumento. La capa más externa es la envoltura glicoproteica, compuesta de una doble capa lipídica sobre la que se sitúan nueve glicoproteínas, que actúan como receptores y permiten la interacción entre el virus y la membrana celular (Xiao et al., 2007) (Figura 1). Tras penetrar en la célula, la nucleocápside se dirige hacia el núcleo celular, donde se libera el ADN. Durante el ciclo lítico, la replicación del material genético

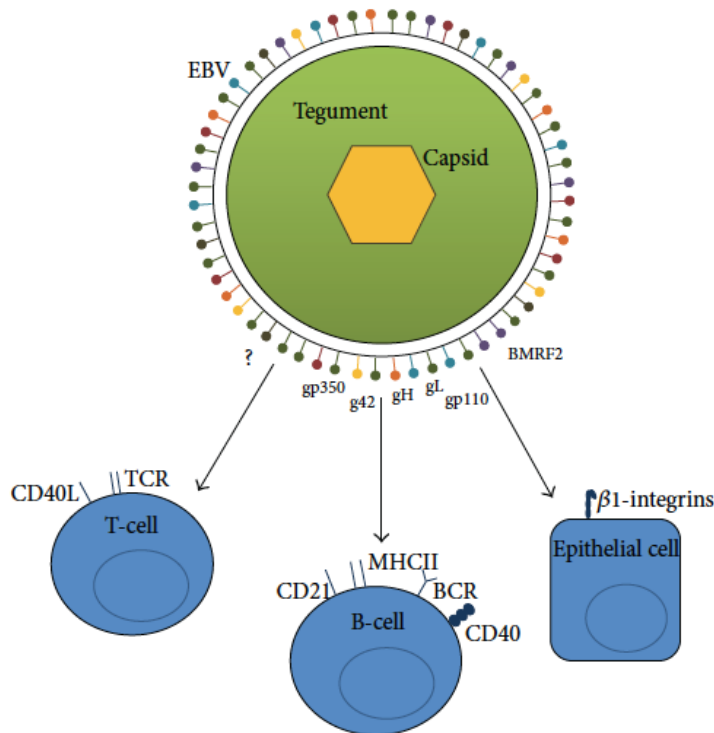


Figura 1. Esquema de la estructura del VEB y moléculas que intervienen en la interacción virus-célula huésped. Adaptada de Draborg et al., 2013

es llevada a cabo por la ADN polimerasa del virus y se produce la síntesis de las diferentes proteínas virales. Tras el ensamblaje de la cápside y la cubierta, el virus se libera por lisis celular, destruyendo la célula huésped (Gulley and Tang, 2008; Thorley-Lawson and Gross, 2009). Durante la infección latente, la doble cadena de ADN viral se circulariza en el núcleo de la célula huésped, el linfocito B, y permanece en reposo en forma de episoma extracromosómico (Adams and Lindahl, 1975). Sólo cuando en condiciones fisiológicas el linfocito B entra en división, el VEB se integra y es replicado por la ADN polimerasa de la célula huésped (Miyashita et al., 1997).

### c) **Genoma viral y programas de latencia**

El genoma del VEB posee más de 100 genes, que se expresan casi en su totalidad durante la fase replicativa o lítica. Estos genes se encargan de codificar las proteínas necesarias para la producción de nuevos viriones infectivos (p.ej. ADN polimerasa, helicasa, primasa, proteína kinasa) (Young and Rickinson, 2004; Roizman 2013).

Durante la infección latente, la expresión genómica se restringe a un número limitado de genes, y en función del perfil de proteínas expresadas, se conocen 4 programas llamados de latencia (Kang and Kieff, 2015). El virus adapta su expresión genética según la fase madurativa de la célula huésped, el linfocito B (Thorley-Lawson and Gross, 2009).

- Programa de latencia 0: ocurre en el linfocito B memoria que circula en sangre periférica y se caracteriza por la cuasi ausencia de expresión proteica.
- Programa de latencia 1: ocurre en el linfocito B memoria que se divide fisiológicamente en sangre periférica. La expresión se reduce a la proteína EBNA-1.
- Programa de latencia 2 (por defecto): se produce en el linfoblasto del centro germinal situado en el anillo de Waldeyer. La expresión de proteínas latentes se restringe a las

proteínas EBNA-1 y proteínas latentes de membrana (*latent membrane protein*, LMP-1 y LMP-2A).

- Programa de latencia 3 (de crecimiento): tiene lugar en el linfocito B *naive* (tonsilar) y se caracteriza por la expresión de la totalidad de proteínas latentes (complejo EBNA y LMP-1, 2A y 2B).

<b>Programa de latencia</b>	<b>Genes expresados</b>	<b>Función</b>	<b>Tipo de célula B infectada</b>	<b>Tipo de tumor</b>
Crecimiento (latencia 3)	EBNA-1 hasta EBNA-6, LMP-1, 2A y 2B	Activación del linfocito B <i>naive</i>	Anillo Waldeyer	Linfoma Inmunoblástico
Por defecto (latencia 2)	EBNA-1, LMP-1 y 2A	Diferenciación del linfocito B activado en linfocito B memoria	Centro germinal del anillo de Waldayer	Linfoma Hodgkin
Latencia 1	EBNA-1	División del ADN viral en el linfocito B que se divide	Linfocito B memoria de sangre periférica en división	Linfoma Burkitt
Latencia 0	Ninguno	Infección silente en el linfocito B	Linfocito B memoria de sangre periférica	
Lítico	Todos los genes líticos	Replicación del virus en la célula plasmática	Célula plasmática	

**Tabla 2. Programas genéticos utilizados por el VEB en su célula huésped (tumoral o no tumoral). Esta tabla está adaptada de la referencia Thorley-Lawson, 2015 y Cohen 2000**

El virus posee nueve proteínas latentes: seis proteínas que se encuentran en el núcleo (EBNA-1, 2, 3a, 3b, 3c y LP) y tres en la membrana (LMP-1, LMP-2A y LMP-2B) (Kang and Kieff, 2015). La expresión de las proteínas latentes virales está bajo el control de un factor de transcripción maestro, el EBNA-2. Las proteínas latentes son las responsables de estimular la proliferación celular y promover *in vitro* la transformación de células B en reposo en blastos proliferativos (Thorley-Lawson and Gross, 2009). Durante la infección latente, el

virus codifica además tres ácidos ribonucleicos (ARN): dos ARNs poliadenilados sin expresión proteica llamados EBER-1 y EBER-2 (*EBV-Encoded RNAs*) y BARTs (*Bam A Rightward Transcripts*) que codifica aproximadamente 40 microARNs (Kang and Kieff, 2015; Kuzembayeva et al., 2014). Al igual que las proteínas latentes, los ARN EBER-1 y 2 y las secuencias BARTs desempeñan funciones relacionadas con la supervivencia y proliferación de las células infectadas (Wang et al., 2018). La figura 2 representa el genoma de las proteínas latentes del VEB.

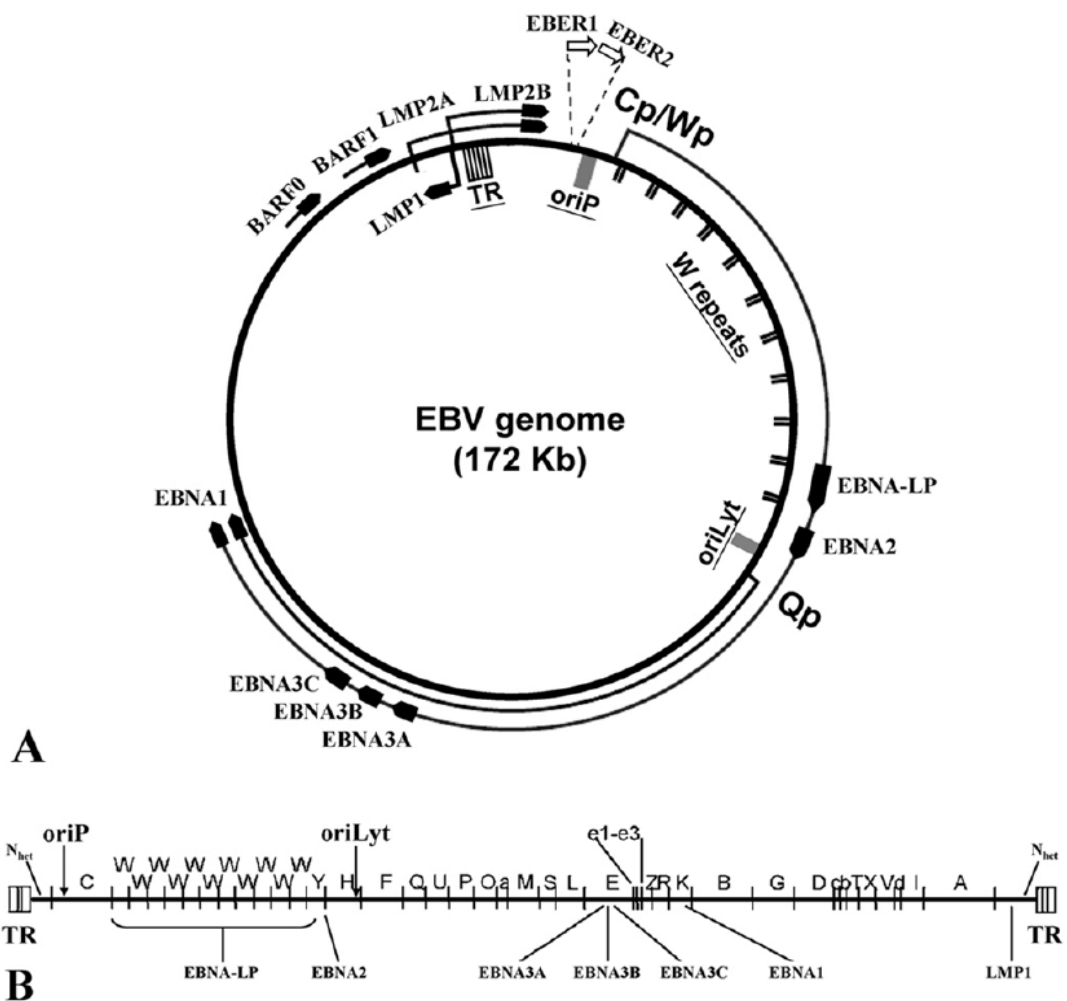


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VEB y principales proteínas latentes. Figura adaptada de Young and Rickinson, 2004

A continuación, se describen brevemente algunas de las funciones desempeñadas por las proteínas latentes:

- EBNA-1: permite la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped, permitiendo la replicación del virus por la ADN polimerasa celular cuando ésta se divide (Miyashita et al., 1997).
- EBNA-2: es el factor de transcripción más importante del VEB y es el responsable de promover la expresión de todo el repertorio de proteínas latentes del virus. Esta función es desempeñada a través de la interacción con una serie de promotores celulares y virales, sin una acción directa sobre el ADN celular. El principal factor de transcripción celular activado por EBNA-2 es el RBP- $\kappa$ J (*Recombination Signal-binding immunoglobulin  $\kappa$ J region*) que puede tener hasta 20.000 sitios de unión al ADN de la célula huésped (Saha and Robertson, 2019). La proteína EBNA-2 es la responsable de la emergencia de un linfoblasto activado, capaz de proliferar en respuesta a los estímulos dirigidos por el resto de proteínas latentes y por la célula huésped (Kang and Kieff, 2015; Thorley-Lawson and Gross, 2009).
- EBNA-3: incluye un complejo de 3 proteínas (EBNA-3A, 3B,3C) con funciones relacionadas con la supervivencia y el crecimiento (Young and Rickinson, 2004). Mutaciones en las proteínas EBNA-3A y -3C impiden la transformación en blasto del linfocito B infectado. EBNA-3C actúa como un oncogen y permite al linfocito B progresar en el ciclo celular.
- LMP-1: es un homólogo del receptor de la célula T helper (CD40) del linfocito B (Uchida et al., 1999). Gracias a la interacción con su ligando, el linfocito B recibe las señales de supervivencia y crecimiento necesarias para impedir su apoptosis y estimular su

proliferación. El receptor CD40 pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). La proteína LMP-1 reproduce los efectos del receptor CD40, y activa vías de señalización que contribuyen a la inducción de genes con funciones antiapoptóticas y la producción de citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1) y CD40 ligando (Young and Rickinson, 2004).

- LMP-2A, homólogo funcional del receptor del linfocito B (*B cell receptor*, BCR). Su señal permite la selección positiva del linfocito B en la médula espinal y su supervivencia en sangre periférica en ausencia de estímulo antigénico afín (Mancao et al., 2005)

En la actualidad, se sabe que no sólo las proteínas latentes sino también algunas de las proteínas expresadas durante la fase lítica, intervienen en la evasión inmune a través de mecanismos que inhiben la inmunidad celular T y la producción del interferón gamma (INF- $\gamma$ ). Es el caso, por ejemplo, de la proteína BHRF-1 y BCRF-1. El gen de la proteína BHRF-1 (gen del antígeno temprano o *early antigen*, EA-R) presenta una gran homología con el gen BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) conocido por sus propiedades antiapoptóticas (Bellows et al., 2002; Cleary et al., 1986). El BCRF-1 posee una actividad biológica y secuencia de aminoácidos casi idéntica a la IL-10 humana capaz de inhibir la síntesis de INF- $\gamma$  y suprimir la acción de los linfocitos T citotóxicos (Hsu et al., 1990).

<b>Función</b>	<b>Proteína</b>
Proteínas latentes	EBNA-1, EBNA-LP, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C
Glicoproteínas entrada célula huésped	gp350, gp42, BMRF2, gpH, gpL, gp110
Proteínas de cubierta	gN, gp150, BILF2, BILF1, BDLF2
Iniciación del ciclo lítico	BZLF1, BRLF1, EA/D, BSLF1, BBLF4 y 2/3, BALF 5 y 2
Evasión inmune	IL10 viral (BCRF1), LF2, BNLF2a, BMLF1, BSLF2
Antiapoptóticas	EA/R, BALF1, LMP1, LMP2

**Tabla 3. Funciones de algunas de las proteínas del VEB**  
 Tabla adaptada de Draborg et al., 2013

**d) Ciclo replicativo. Teoría del centro germinal**

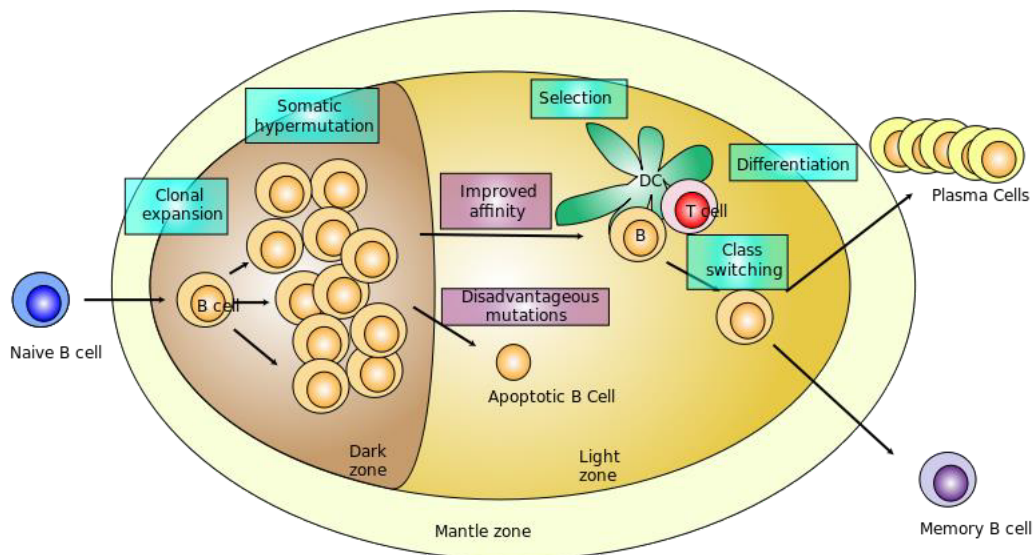
El VEB es un virus con tropismo linfoepitelial que se trasmite fundamentalmente a través de la saliva. La célula diana del VEB es el linfocito B memoria pero el VEB también es capaz de infectar otro tipo de células, como epiteliales, linfocitos T o miocitos (Coleman et al., 2018; Jenson, 2006).

Gracias a sus glicoproteínas de superficie, el VEB interacciona con las células epiteliales de la mucosa oral y los linfocitos B situados en la criptas del tejido linfoepitelial, que constituyen el llamado anillo de Waldeyer (Thorley-Lawson, 2015).

El VEB utiliza la glicoproteína 350 para adherirse a la molécula CD21 del linfocito B (receptor de complemento C3d) y requiere la interacción de la glicoproteína gp42 con un ligando del complejo mayor de histocompatibilidad II (*Major histocompatibility complex*, MHC II) para asegurar su entrada en la célula diana (Li et al., 1997; Nemerow et al., 1985). La interacción entre el VEB y las células epiteliales es menos conocida, y se cree que esta mediada por las glicoproteínas de superficie gH-gL (Borza and Hutt-Fletcher, 2002).

A continuación, describimos brevemente la teoría del centro germinal elaborada por David Thorley-Lawson a finales de los años 90 (Babcock et al., 1999). Esta teoría explica cómo el VEB, aprovechando las etapas fisiológicas de maduración del linfocito B y gracias a su maquinaria genética, completa su ciclo vital y establece una infección crónica y asintomática en el linfocito B.

En condiciones normales, cuando el linfocito B *naive* del anillo de Waldeyer entra en contacto con un estímulo antigénico, se activa y prolifera convirtiéndose en linfoblasto. De forma similar, y gracias a la expresión del programa de latencia 3 (programa de crecimiento), el VEB activa el linfocito B en reposo, convirtiéndolo en linfoblasto. El linfocito B activado, como ocurriría de forma fisiológica, migra al folículo del nódulo linfático para situarse en el centro germinal, donde se producen los reordenamientos en los genes de las inmunoglobulinas (Igs) y los fenómenos de hipermutación somática, necesarios para convertirse en una célula B memoria (Figura 3).



**Figura 3. Etapas de maduración del linfocito B en el centro germinal.**  
Fuente: [https://en.wikipedia.org/wiki/Germinal\\_center#/media/File:Germinal\\_center.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Germinal_center#/media/File:Germinal_center.svg)



A través del programa de latencia 2 y la expresión de sus proteínas LMP-1 (homólogo del CD40) y LMP-2A (homólogo del BCR), el VEB reemplaza y genera las señales necesarias para que el linfocito B sobreviva y se transforme en célula memoria. Estas células abandonan el folículo linfático y circulan en sangre periférica y tejidos linfoides asociados. En esta fase, el VEB activa su programa de latencia 0, caracterizado por la ausencia de expresión proteica. Cuando el linfocito B memoria entra en división, el VEB expresa su proteína EBNA-1 (programa de latencia 1) y se replica junto al genoma de la célula huésped. El ciclo se reactiva cuando el linfocito memoria interacciona con su antígeno específico en los tejidos linfoides periféricos y se convierte en célula B plasmática, capaz de producir anticuerpos de alta afinidad antígeno-específico. La diferenciación en célula plasmática induce el *switch* de la fase latente a lítica, con la consiguiente producción de virus infectivos (Figura 4) (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005). Se cree que la infección por contigüidad de las células epiteliales del anillo de Waldeyer amplifica la multiplicación viral y es la responsable en último término de la excreción viral o *shedding* en saliva y de la contaminación de otros sujetos (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005).

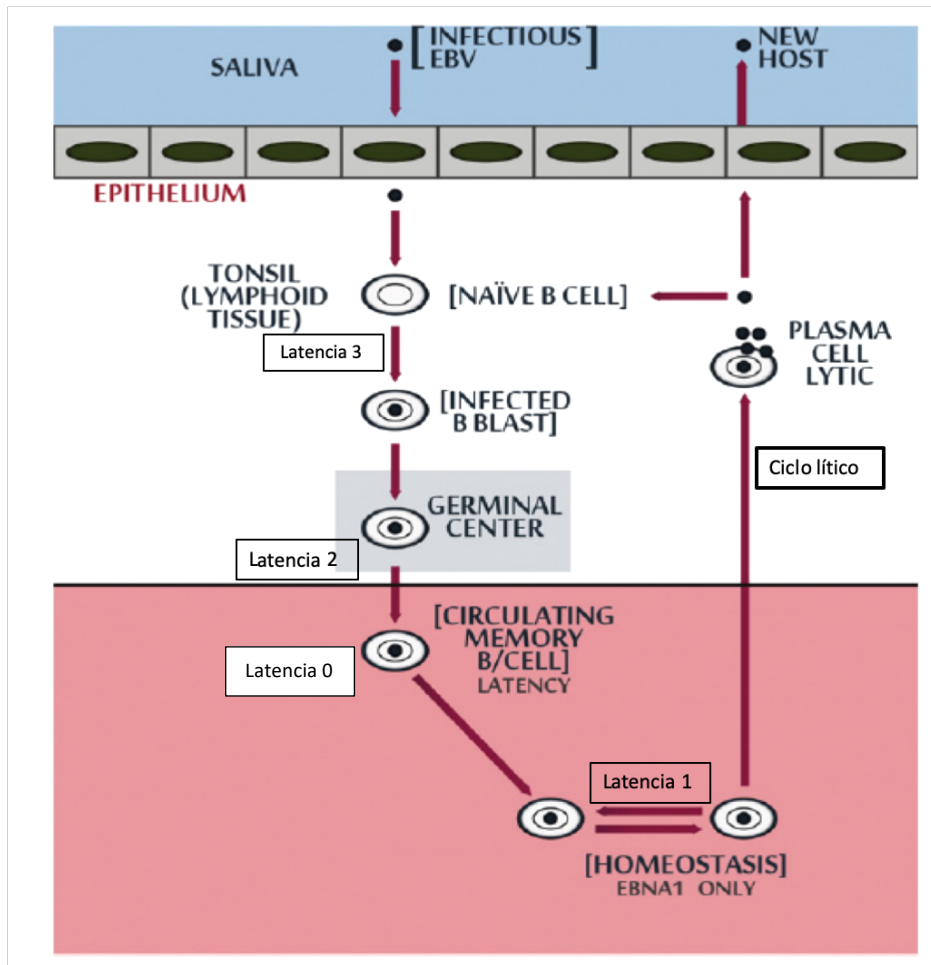


Figura 4. Infección crónica del VEB propuesta por la teoría del centro germinal. Figura adaptada de la referencia Fernández-Menéndez et al., 2016

e) Respuesta inmune

La resolución de la infección aguda por el VEB se produce gracias al concierto de la inmunidad celular y humoral. La respuesta humoral limita la expansión del virus y posee un valor añadido diagnóstico, pero el control de la infección se realiza fundamentalmente gracias a la acción citotóxica de los linfocitos T. Los linfocitos T CD8 destruyen las células infectadas que expresan proteínas virales, principalmente epítopos de proteínas líticas y en menor medida latentes. La respuesta celular es extremadamente vigorosa y cerca del 50% de los linfocitos T CD8 en sangre periférica se dirigen contra los linfocitos B infectados. Estos linfocitos son los responsables de la linfocitosis atípica característica de la

mononucleosis infecciosa (Hislop et al., 2007; Jayasooriya et al., 2015; Rickinson et al., 2014). A su vez, las manifestaciones clínicas de la primoinfección por el VEB no son el resultado del efecto citopático del virus sino de la respuesta citotóxica llevada a cabo por los linfocitos T CD8, con producción de citoquinas e invasión de tejidos (Jayasooriya et al., 2015).

Las diferencias en la respuesta inmunitaria desencadenada en niños y adultos es responsable en parte de la expresión clínica de la primoinfección según la edad (Clute et al., 2010; Rickinson et al., 2014). La respuesta citotóxica que se desarrolla durante la infancia es llevada a cabo fundamentalmente por linfocitos T CD8 *naive*, capaces de producir una respuesta rápida y eficaz contra el virus (Callan et al., 1996). Sin embargo, el repertorio de células T *naive* disminuye con la edad, y la respuesta citotóxica en sujetos más mayores es probablemente efectuada por células T memoria, generadas en respuesta a otros antígenos virales, menos afines a los antígenos del VEB (Huynh and Adler, 2012). La respuesta ineficaz de estas últimas conduciría a una replicación viral más prolongada, perpetuación de la cascada inflamatoria, que daría lugar a un cuadro clínico más florido (Thorley-Lawson, 2015; Williams et al., 2004). Un estudio reciente especula que estos fenómenos inmunológicos podrían estar influenciados por los cambios hormonales que ocurren durante la adolescencia (Rostgaard et al., 2019).

Aunque la respuesta citotóxica es eficaz para controlar la infección aguda, resulta insuficiente para eliminar el virus completamente. Durante la infección latente, el virus reduce su expresión genética al máximo, y se hace invisible al sistema inmune. Se calcula, que en estado de equilibrio, el VEB persiste infectando un pequeño porcentaje de linfocitos B memoria, aproximadamente 1 de cada 10.000 a 100.000 linfocitos circulantes. Este

número permanece prácticamente estable durante años en ausencia de inmunodepresión (Maurmann et al., 2003).

### (1) *Diagnóstico serológico*

La respuesta humoral en respuesta a los antígenos líticos y latentes permite diferenciar la infección aguda de la infección crónica o latente, así como identificar las reactivaciones. El diagnóstico de la infección aguda por el VEB se basa en la presencia de los anticuerpos IgG e IgM dirigidos contra el antígeno de la cápside viral (*viral capsid antigen*, anti-VCA) (Dunmire et al., 2018; Fleisher et al., 1979). Los anticuerpos IgG persisten durante toda la vida del sujeto y traducen una infección crónica latente, mientras que los anticuerpos IgM desaparecen rápidamente. Los anticuerpos IgG contra el antígeno lítico temprano BZLF-1 (anti-EA) aparecen en los primeros días de la infección aguda, pero tienen una vida media corta y desaparecen durante el período de convalecencia (Rahman et al., 1991). La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-VCA, EA y antígeno temprano Zta (anti-Zta), al margen de la infección aguda, son indicativos de una replicación viral activa, como ocurre durante las reactivaciones (Piriou et al., 2009) y también en pacientes con enfermedades asociadas al VEB, como ciertos tumores o enfermedades autoinmunes (Banwell et al.; Coghill and Hildesheim, 2014). Los anticuerpos contra la proteína latente EBNA-1, la única que se expresa en los linfocitos B infectados de forma latente, aparecen tardíamente, a partir del tercer mes de la primoinfección y sus niveles permanecen estables a lo largo de la vida (Abbott et al., 2017). La presencia de anticuerpos IgG anti-EBNA excluye una infección aguda (Balfour et al., 2015; Hess, 2004)(Figura 5).

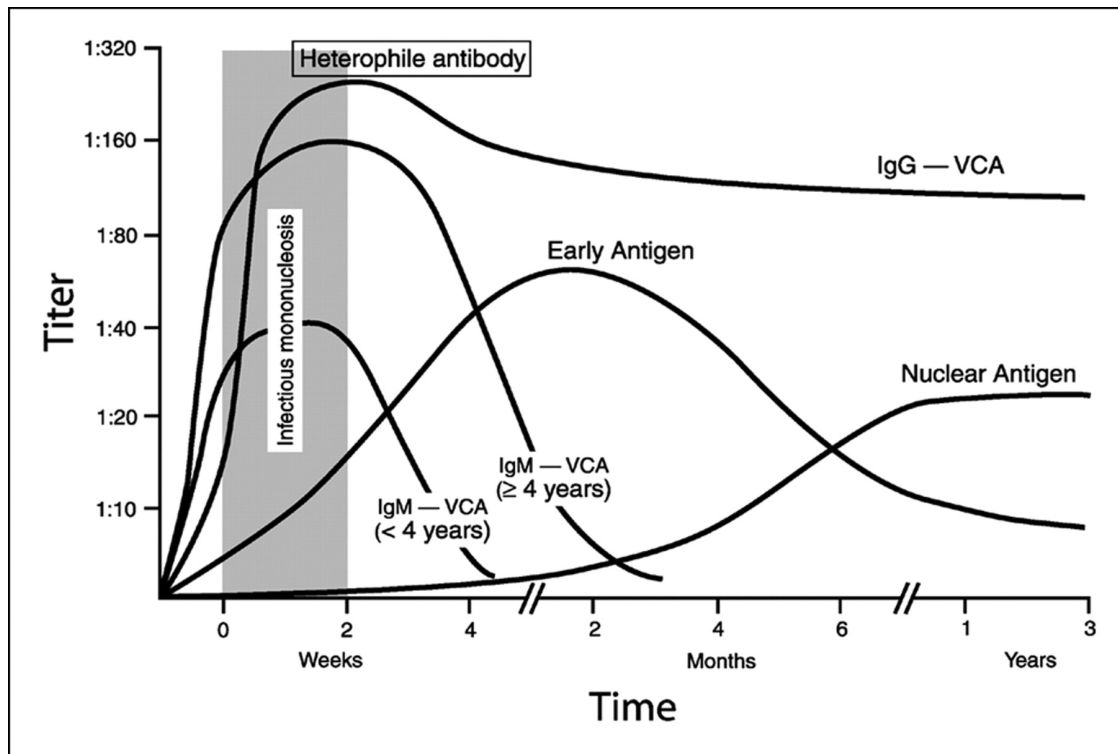


Figura 5. Patrón serológico de la infección por el VEB. Distinción entre infección aguda (reactivación) y crónica. Fuente: <https://virology-online.com/viruses/ebvantibody.jpg>

Aunque los anticuerpos mencionados son útiles en el diagnóstico de la enfermedad, ninguno de ellos tiene capacidad neutralizante. Entre las proteínas capaces de producir anticuerpos neutralizantes, destaca la glicoproteína gp350, proteína más abundante del virus, encargada de la interacción con el receptor CD21 del linfocito B (Nemerow et al., 1987). Los anticuerpos contra la proteína gp350 impiden la infección del linfocito B *in vitro* y su concentración se correlaciona con la capacidad neutralizante del suero humano (Sashihara et al., 2009). El nivel de los anticuerpos IgG gp350 se ha correlacionado inversamente con la gravedad de la mononucleosis infecciosa (Grimm et al., 2016). Esta proteína ha sido utilizada en una vacuna desarrollada contra el VEB, que aunque no resultó eficaz para prevenir la infección, reducía la intensidad de los síntomas asociados a la misma (Cohen, 2018).

### 2. VÍAS DE TRASMISIÓN

La saliva es considerada como la principal fuente de transmisión del VEB, aunque el virus es detectable en muchas otras secreciones mucosas y en sangre periférica.

En los niños, la infección por el VEB se adquiere fundamentalmente por contacto directo o a través de fómites con saliva contaminada, o a partir de ciertas prácticas, propias de sociedades más primitivas, como la premasticación de alimentos (Grose and Johanson, 2016; Cedeberg et al., 2019). La contaminación entre adolescentes y adultos jóvenes se produce fundamentalmente por el contacto con saliva a través del beso (Balfour et al., 2013). Durante la primoinfección, el VEB es detectable en grandes cantidades en saliva y sangre periférica (Mbulaiteye et al., 2006; Niederman et al., 1976). La excreción del VEB en saliva, pasada la infección aguda, es un proceso continuo caracterizado por importantes variaciones en un mismo sujeto. Sus niveles pueden permanecer estables durante horas o a lo largo del día y fluctuar enormemente en períodos más largos (Hadinoto et al., 2009).

El ADN del VEB también ha sido detectado en secreciones genitales femeninas y masculinas. En varones, entre el 0.4 al 45% de muestras de semen de pacientes seropositivos al VEB son positivas en ADN, incluso cuando este no es detectable en sangre (Kaspersen et al., 2012). El ADN está asociado a la fracción celular del semen, y se correlaciona con la cifra de leucocitos (Neofytou et al., 2009). Estudios epidemiológicos muestran una fuerte correlación entre el número de parejas sexuales y la seroconversión por el VEB y/o antecedentes de mononucleosis infecciosa sugiriendo la posibilidad de la transmisión sexual (Thomas et al., 2006).

La presencia del VEB en secreciones cervicales se ha descrito en un 10% de mujeres jóvenes y sanas en un estudio sueco (Berntsson et al., 2013). A pesar de ello, y aunque se

han descrito casos de infección congénita en la literatura, la transmisión madre-hijo durante el parto parece ser anecdótica. La seroprevalencia del VEB es superior al 90% entre las mujeres en edad de procrear y no existen datos suficientes para demostrar que las reactivaciones del VEB son más frecuentes durante el embarazo (Haeri et al., 2010).

El VEB también está presente en la leche materna. El ADN del VEB fue aislado por primera vez en la fracción celular de aproximadamente el 50% de muestras de leche de madres sanas (Junker et al., 1991). El *shedding* del VEB durante la lactancia se incrementa entre la tercera y duodécima semana, y es menor en las madres que dan a luz prematuramente (Junker et al., 1991). El ADN del VEB también está presente en la fracción acelular o lactosera (Daud, 2015). Sin embargo, la prevalencia de la infección por el VEB no es mayor entre los niños lactantes con respecto a los no lactantes y la lactancia materna no se considera un factor de riesgo para la transmisión perinatal del VEB (Biggar et al., 1978; Gantt et al., 2008). Sin embargo, la presencia del VEB en la leche materna se ha relacionado con la transmisión madre-hijo del VIH (Pitt et al., 1998; Viljoen et al., 2015).

El ADN del VEB es fácilmente cuantificable en sangre total, asociado al compartimento celular, y se encuentra raramente en plasma (Stevens et al., 2002). Tanto la transfusión de derivados sanguíneos (Alfieri et al., 1996) como el trasplante de células hematopoyéticas o de órgano sólido pueden conllevar la transmisión del VEB a un receptor previamente seronegativo (Shapiro et al., 1988) y producir un cuadro clínico de mononucleosis infecciosa (Balfour et al., 2015).

### 3. EPIDEMIOLOGÍA

La seroprevalencia de la infección por el VEB se incrementa con la edad y más del 90% de la población presenta anticuerpos contra el VEB en la edad adulta (Henle and Henle, 1979).

La edad de adquisición del VEB varía en función de la localización geográfica y está influida por factores socioeconómicos y demográficos (Macswen and Crawford, 2003). Un nivel socioeconómico bajo, menor educación de los padres o el hecho de vivir en colectividad (compartir habitación, acudir a guarderías, etc.) se han identificado como factores de riesgo para la adquisición temprana del VEB (Biggar et al., 1978a; Cohen, 2000; Condon et al., 2014).

La infección por el VEB se adquiere frecuentemente durante la infancia, de forma precoz en los países de renta baja o en áreas desfavorecidas de países ricos (Jayasooriya et al., 2015) (Figueira-Silva and Pereira, 2004). En los últimos años, se objetiva un descenso progresivo de la incidencia de la infección por el VEB, con un retraso en la edad de adquisición, probablemente en relación con los cambios en el estilo de vida y la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias (Balfour et al., 2013; Fourcade et al., 2017).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en la década de los 2000 sugieren que la infección por el VEB, especialmente en edades tempranas, podría estar relacionada con el origen étnico/racial (Condon et al., 2014). En la ciudad de Mineapolis, el 53% de niños de origen afroamericano y el 37% de origen multiracial presentaban anticuerpos contra el VEB a los 5 años de edad frente sólo al 17% de los niños de origen caucásico (Condon et al., 2014). En los últimos, sólo el 50% habían seroconvertido a los 18 años de edad. En este estudio, también se observa que existía una fuerte concordancia en las tasas de seroconversión entre los niños de una misma familia, lo que



indicaría una cierta predisposición genética a la hora de adquirir la infección (Condon et al., 2014). Otro estudio, esta vez realizado en Europa, confirma que existen diferencias en la edad de seroconversión entre diversos grupos étnicos analizados en la ciudad de Rotterdam. Estas diferencias se justificaban en buena parte al tener en cuenta variables de tipo socioeconómico (Jansen et al., 2016). Por último, un estudio más reciente llevado a cabo en Reino Unido, muestra igualmente que la seroconversión al VEB es más precoz en niños de origen pakistaní que en sus homólogos de origen caucásico (50% versus 25% a los 2 años de vida) (Pembrey et al., 2019).

En otros países menos industrializados, también se observan diferencias en la edad de seroconversión atendiendo a variables socioeconómicas. En un barrio desfavorecido de la ciudad Sao Paulo (Brasil), la seroprevalencia en niños menores de 21 años era del 71%, mientras que en un barrio rico de la misma ciudad era del 54% (Figueira-Silva and Pereira, 2004).

En países asiáticos, la primoinfección por el VEB suele producirse a edades tempranas. En un estudio realizado en Hong Kong, la seroconversión se producía en el 60% de los niños a los 2 años de edad, aumentado entre el 80-90% entre los 6 y 8 años (Chan et al., 2001; Xiong et al., 2014). Según un estudio malayo llevado a cabo en los años 80, la aparición de anticuerpos IgM anti-VCA sugestivos de una primoinfección, se producía a partir de los 4 y 6 meses de edad y el 100% de los 80 niños estudiados poseían anticuerpos IgG anti-VCA contra el VEB a los 8 años (Yadav et al., 1987).

La infección temprana por el VEB también se ha descrito en poblaciones esquimales y se ha implicado como factor causal de un tumor típicamente asociado al VEB, el carcinoma nasofaríngeo. Según un estudio realizado en los años 80, el 88% de los niños

esquimales presentaban anticuerpos contra el VEB al año de edad, en comparación con el 55% de los niños de origen danés utilizado como grupo control (Melbye et al., 1984).

En África Subsahariana, la infección por el VEB se produce durante la primera infancia, y estudios realizados a lo largo de años 70, muestran que cerca del 50% de los niños se han infectado en el primer año de vida y que la mayoría de niños presentan anticuerpos contra el VEB a los 2 años (Biggar et al., 1978b; de-The et al., 1975; Minhas et al., 2010). En África Subsahariana, tanto la infección por VIH como por malaria en los niños, se han identificado como factores favorecederos de la adquisición temprana del VEB. Estudios realizados en Kenia, muestran que la prevalencia de la infección al año de vida se eleva al 80% entre los niños expuestos e infectados por VIH (*HIV exposed infected*, HEI) (Slyker et al., 2013) siendo prácticamente del 100% entre los niños fuertemente expuestos a la malaria (Piriou et al., 2012).

#### 4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El VEB produce una infección crónica y, en la mayoría de los casos, asintomática durante toda la vida del individuo infectado. Sin embargo, la primoinfección por el VEB es la causa más frecuente del síndrome conocido como mononucleosis infecciosa y la infección latente está relacionada con un amplio abanico de tumores de estirpe linfoepitelial y posiblemente con enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple.

<b>Papel definitivo</b>	<b>Asociación fuerte</b>	<b>Asociación controvertida</b>
Mononucleosis infecciosa Enfermedad linfoproliferativa asociada al cromosoma X	Linfoma Burkitt Linfoma de células B en pacientes inmunodeprimidos Linfoma Hodgkin Linfoma nasal célula NK-T Carcinoma nasofaríngeo Leiomioma	Artritis reumatoide Lupus eritematoso sistémico Esclerosis múltiple Síndrome de Sjögren Síndrome de fatiga crónica Cáncer de mama

**Tabla 4. Patología asociada con el VEB. Tabla tomada de la referencia Thorley-Lawson 2004.**

**a) Primoinfección**

Las manifestaciones clínicas de la primoinfección por el VEB varían según la edad de adquisición.

Durante la adolescencia, la primoinfección por el VEB es sintomática en un 25 a 75% de casos y produce el conocido síndrome de mononucleosis infecciosa (Balfour et al., 2013). Este síndrome se caracteriza por la tríada de fiebre, faringitis y linfadenopatía, y en más del 10% de casos asocia hepatoesplenomegalia. En ocasiones, puede cursar con complicaciones graves (p.ej. rotura esplénica, obstrucción de la vía aérea, síndrome de Guillain Barre, meningoencefalitis). La mononucleosis infecciosa es una de las causas más comunes de enfermedad prolongada en adolescentes en países occidentales. El período de convalecencia puede prolongarse durante meses, y se caracteriza por un síndrome de fatiga prolongada, hipersomnolencia y en ocasiones, síntomas depresivos. Pero además, la mononucleosis infecciosa se ha identificado como un factor de riesgo de patologías importantes, como el Linfoma Hodgkin (LH) y la esclerosis múltiple, aunque se desconocen los mecanismos implicados en estas asociaciones (Handel et al., 2010; Hjalgrim et al., 2007).

La primoinfección en cambio, suele pasar desapercibida durante la infancia. Sin embargo, varios estudios han descrito la presencia de síntomas clínicos, ya sean típicos -

como fiebre, linfadenopatías y amigdalitis- o atípicos – rinitis, otitis– en niños pequeños. (Sumaya and Ench, 1985; Chan et al., 2003; Garcia-Peris et al., 2019). La sintomatología suele ser mas atípica cuanto menor es la edad de adquisición (Sumaya and Ench, 1985; Garcia-Peris et al., 2019) y se han descrito un mayor número de complicaciones neurológicas, respiratorias o hematológicas (Sumaya and Ench, 1985). La presencia de la linfocitosis atípica parece ser menos marcada que la descrita en adultos.

Aunque la infección por el VEB durante la infancia se considera un proceso benigno, la infección precoz por el VEB se ha asociado con la aparición de ciertos tumores, como el Linfoma Burkitt endémico (LBe) (Piriou et al., 2012; Slyker et al., 2013) o el carcinoma nasofaríngeo (Melbye et al., 1984). La infección durante la infancia también se ha vinculado con el desarrollo de ciertas patologías autoinmunes, como la esclerosis múltiple (Banwell et al., 2007; Nielsen et al., 2007).

### **b) Tumores relacionados con el VEB**

El VEB fue el primer virus aislado en células cancerígenas procedentes de muestras histológicas de un niño africano afecto de LBe. El VEB se convirtió entonces en el primer virus oncogénico conocido y fue calificado como agente carcinogénico del grupo 1 por la AIRC (“IARC Monographs – disponible en formato PDF” n.d.; Perera et al., 2010).

El VEB está asociado a una gran variedad de tumores de naturaleza linfoepitelial, algunos de ellos con una distribución endémica -como el carcinoma nasofaríngeo o el LBe- y procesos linfoproliferativos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

El origen de los tumores asociados al VEB está estrechamente relacionado con la propiedad de sus diversas proteínas de estimular el crecimiento celular. Las células de los

tumores asociados al VEB expresan uno de los 4 programas de latencia característicos del ciclo viral del VEB (Cohen, 2000). En pacientes inmunodeprimidos, la ausencia de una respuesta inmunitaria eficaz, facilitaría la supervivencia de células con capacidad proliferativa y la emergencia de tumores.

A continuación se detallan los mecanismos implicados en el origen de ciertos tumores ligados al VEB, en particular del LBe y LH. Describiremos brevemente la asociación con otro tipo de tumores y enfermedades autoinmunes.

## INTRODUCCIÓN

Tumor	Subtipo	Cofactores	% VEB +	Latencia
Linfomas B	Linfoma postrasplante Linfomas pacientes VIH	Inmunosupresión T profunda	100	III
Linfoma Hodgkin	Celularidad mixta Esclerosis nodular LH-VIH: celularidad mixta	? ? Estadio intermedio	80-90 15-20 >90	II
Linfoma Burkitt	Endémico Esporádico Asociado al VIH	Malaria ? Estadio temprano	100 10-85 30-40	I
Linfoma difuso de célula B grande	LDCBG-NOS LDCBG CI LDCBG – fibrina asociado LDCBG-VIH	Inmunosenescencia? Inflamacion crónica Microambiente fibrina Estadio intermedio	10 100 100 30-35	II o III II o III II o III I, II o III
Otras lesiones B raras	Granulomatosis linfomatoide Úlcera mucocutánea	Inmunodeficiencia Inmunosenescencia	100	II o III
Linfoma plasmoblástico		VIH, inmunodeficiencia	80	I o III
Linfoma efusión primaria		HHV-8, estadio tardío VIH	80	I o II/III
Linfomas T/NK	Infección crónica EBV Linfoma T sistémico de la infancia Linfoma extranodal célula NK/T Leucemia NK agresiva	Inflamación crónica?	95-100	Latencia I/II
Carcinoma nasofaríngeo	Tipo LEL ( <i>lymphoepithelial-like</i> )	Génética/carcinógenos/Inflamación crónica?	100	Latencia I/II o II
Carcinoma gástrico	Tipo LEL Adenocarcinoma	Inflamación crónica? H.pylori/inflamación?	90 5-10	Latencia I (o I/II)
Leiomioma	Postrasplante VIH asociado	Inmunodepresión profunda	100	EBNA2+/LMP1-

**Tabla 5. Principales tumores asociados con el VEB. Tabla adaptada de la referencia Shannon-Lowe and Rickinson 2019**

(1) *Linfoma Burkitt*

El LB fue el primer tumor humano que se asoció a un virus y supone casi un 40% de los linfomas no hodgkinianos (LNH) en la infancia. Se reconocen tres variantes clínicas: endémico (asociado en más del 95% de casos al VEB), asociado al VIH (20-40% ligado al VEB) y el esporádico (sólo 2% relacionado con el VEB) (Molyneux et al., 2012).

El LBe constituye el tumor pediátrico más frecuente en África ecuatorial y su distribución geográfica se superpone con las áreas hiperendémicas de malaria. El pico de incidencia del LBe se calcula hacia los 6 años de edad y es 2 veces más frecuente en niños que en niñas (Molyneux et al., 2012).

Se cree que el LBe emerge de una célula B del centro germinal en camino hacia la diferenciación en célula memoria. Esta célula expresa el programa de latencia 1 (EBNA-1), característico del linfocito B en reposo y se caracteriza por la cuasi ausencia de expresión proteica y por tanto por un reconocimiento inmune débil (Rowe et al., 1987; Tao et al., 1998).

La célula del LBe contiene una translocación cromosómica característica que involucra al protooncogén c-MYC, situado en el cromosoma 8. La translocación del cromosoma 8 a la región constante del gen de las cadenas pesadas (cromosoma 14) o ligeras (22 o 2) de las Igs, conduce a la sobreexpresión de este oncogén, cuyas funciones están estrechamente relacionadas con la proliferación, la apoptosis y el metabolismo celular (Brady et al., 2007).

Existen numerosas observaciones que implican al VEB y al *Plasmodium falciparum* (*P.falciparum*) en la patogénesis de LBe y se cree que ambos patógenos podrían actuar de forma sinérgica a nivel molecular favoreciendo la aparición de células tumorales (de-The et al., 1975; Rochford et al., 2005; Molyneux et al., 2012). La infección por malaria debilita la

respuesta inmune contra el VEB y las infecciones repetidas producen una hiperestimulación de los linfocitos B que conllevan una expansión del reservorio del VEB. Algunos de los antígenos maláricos, como el dominio  $\alpha$ -1 rico en cisteína de la proteína de la membrana eritrocitaria del *P. falciparum*, tienen la propiedad de activar al linfocito B y desencadenar la replicación lítica del VEB (Donati et al., 2004). Por otro lado, el *P. falciparum* posee un ligando del receptor de tipo Toll 9 (*toll-like receptor*, TLR), cuya interacción induce la expresión de la enzima Deaminasa de Citosina Inducida por Activación (*Activation Induced Cytosine Deaminase*, AID)(Simone et al., 2011). Esta enzima está involucrada en los fenómenos de hipermutación somática y reordenamiento de genes asociados al cambio de clases Igs y su estimulación favorece la aparición de mutaciones (Ramiro et al., 2006). Bajo la acción de esta enzima, los linfocitos B del centro germinal tendrían más posibilidades de sufrir translocaciones cromosómicas, como la t(8;14) (Molyneux et al., 2012). En relación con la patogénesis de LBe, el *P. falciparum* ha sido clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como un carcinógeno probable del grupo 2A (Bouvard et al., 2012).

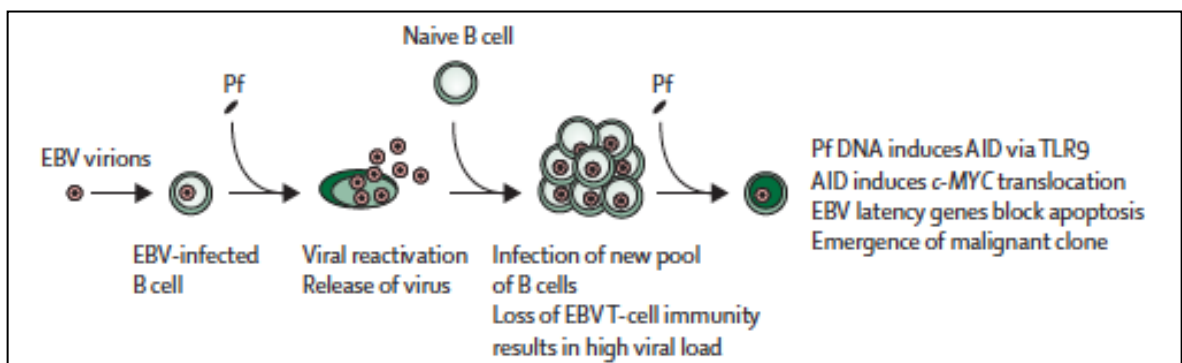


Figura 6. Representación de la interacción entre el VEB y el *Plasmodium falciparum* (Pf) en la génesis del Linfoma Burkitt endémico. Figura adaptada de la referencia Molyneux et al., 2012



(2) *Linfoma Hodgkin (LH)*

El LH es una neoplasia de naturaleza linfoide, caracterizada por la presencia de células malignas de estirpe B, llamadas de Reed–Sternberg (RS) junto con una población heterogénea de células inflamatorias no neoplásicas. El LH representa el 10% de los linfomas en países ricos, y un 0.6% de todos los cánceres en todo el mundo (Zhang et al., 2014).

En función de la morfología e inmunofenotipo, la OMS distingue 2 tipos de LH: la forma clásica, que representa el 90% de los LH, y de predominio linfocítico. La forma clásica contiene cuatro subtipos histológicos: celularidad mixta, esclerosis nodular, rico en linfocitos y con depleción en linfocitos (Zhang et al., 2014).

La distribución de estos subtipos varía según el área geográfica, la edad, factores socioeconómicos, étnicos/raciales, así como la presencia del VEB (Glaser et al., 1997; Kanakry et al., 2013). Estudios epidemiológicos han demostrado que el VEB está presente en más del 40% de LH clásico, especialmente en los subtipos celularidad mixta y pobre en linfocitos (Macswen and Crawford, 2003).

Existen dos picos de incidencia del LH, el primero en niños y jóvenes y un segundo en adultos a partir de los 50 años. Entre los más jóvenes, el pico es más precoz en países de baja renta (5–10 años) en comparación con países ricos (15–35 años), simulando el patrón de la mononucleosis infecciosa. En el caso de los LH asociados al VEB, se cree que el pico durante la infancia estaría en relación con la primoinfección, y en adultos, con la perturbación de la respuesta inmune ligada a la inmunosenescencia (Macswen and Crawford, 2003).

Existen numerosas pruebas que vinculan al VEB con el LH, comenzando por la presencia de episomas monoclonales del VEB objetivados en las células RS (Zhang et al., 2014). Los pacientes con LH presentan un título elevado de anticuerpos anti-VCA y el riesgo de aparición del LH se multiplica por cuatro en los pacientes que han padecido una mononucleosis infecciosa, con un aumento máximo de la incidencia a los cinco años de la infección (Mueller et al., 1989).

Las células RS derivan de células B del centro germinal con reordenamientos no funcionales de los genes de Igs (Marafioti et al., 2000). Las células de RS expresan el programa de latencia 2 (por defecto) y se cree que gracias a la expresión de las proteínas latentes LMP-1 and LMP-2 del VEB, estas células defectivas reciben las señales necesarias para sobrevivir y multiplicarse (Macswen and Crawford, 2003).

La célula de RS se caracteriza por la pérdida casi completa del perfil genético de un linfocito B normal y por la presencia de múltiples mutaciones en genes relacionados con la supervivencia y proliferación celular (protooncogenes) o en miembros de las vías de señalización intracelular NF- $\kappa$ B y JAK-STAT (*nuclear factor kappa-B: NF- $\kappa$ B* y *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) (Dolcetti et al., 2016).

En la actualidad se considera que la interacción entre las células tumorales y las células del microambiente tumoral (células inflamatorias y fibroblastos), a través de señales auto y paracrinas, son esenciales en la patogénesis del tumor (Aldinucci et al., 2010). Se sabe por ejemplo que la interacción de la célula de RS con el colágeno de la matriz extracelular a través de un receptor de tipo tirosina kinasa (*discoidin domain receptor 1,*

DDR1) es capaz de activar la vía de señalización NF- $\kappa$ B, implicada en la inhibición de la apoptosis (Carbone and Gloghini, 2013; Das et al., 2006).

En el caso de los LH ligados al VEB, se cree que el VEB posee la capacidad de sustituir funcionalmente el efecto de las mutaciones genéticas características de las células de RS. Por ejemplo, la proteína LMP-1 promueve la activación de la vía NF- $\kappa$ B, al igual que las mutaciones que afectan al inhibidor TNFAIP3 (*tumor necrosis factor- alpha induced protein*) más frecuentes en los LH no asociados al VEB (Renné et al., 2007). El papel linfogénico del VEB parece también estar relacionado con su capacidad de estimular la producción de ciertas citoquinas e influenciar el microambiente tumoral (Chetaille et al., 2009). LMP-1 induce la producción de las interleuquinas IL-6, IL-8 and IL-10, con funciones inmunosupresores (Eliopoulos et al., 1999). La proteína latente LMP-1, sobreexpresada en las células de RS, es capaz de estimular la expresión del DDR1 implicado en la interacción con el colágeno circundante, que posee un efecto antiapoptótico (Cader et al., 2013; Carbone and Gloghini, 2013).

### (3) *Carcinoma nasofaríngeo*

El carcinoma nasofaríngeo es un tumor endémico en el sudeste asiático, y su prevalencia también esta incrementada en poblaciones del norte de África y en esquimales del Polo Ártico, con un pico de incidencia entre los 40 y 60 años de edad (Cohen, 2000). Se cree que el carcinoma nasofaríngeo es consecuencia de la interacción de factores genéticos, la infección precoz por el VEB y determinados hábitos alimenticios, como el consumo de pescado salado. En el caso del carcinoma anaplásico o pobremente diferenciado, el genoma del VEB está presente en el 100% de las células cancerígenas (Pathmanathan et al., 1995).

En el carcinoma nasofaríngeo, el VEB establece una latencia de tipo 2 y utiliza mecanismos oncogénicos relacionados con la sobreexpresión de transcritos BARTs y micro ARNs, diferentes a los encontrados en los linfomas (Tsao et al., 2015). En este tumor, la producción de la IL-10 codificada por el virus esta incrementada y estimula la producción de IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$  por las células epiteliales y las células T, implicadas en la evasión inmune y crecimiento del tumor. También se ha objetivado una superexpresión de gen BCL-2 con actividad antiapoptótica (Tsao et al., 2015).

#### (4) *Trastorno linfoproliferativo postransplante*

Los trastornos linfoproliferativos postransplante son tumores oportunistas que aparecen como consecuencia del tratamiento inmunodepresor postransplante (Paya et al., 1999). Las manifestaciones clínicas son muy variables y el pronóstico frecuentemente fatal. En los niños, suelen ser consecuencia de la primoinfección por el VEB y pueden cursar inicialmente como un síndrome mononucleósico (Ho et al., 1988). En los adultos previamente seropositivos al VEB, frecuentemente se manifiesta como un tumor extranodal con predilección por determinadas localizaciones, como el sistema nervioso central, intestino o el órgano trasplantado (Macswen and Crawford, 2003).

Las células tumorales se caracterizan por expresar el programa de latencia 3 o de crecimiento (expresión de todos los genes latentes del virus) y se encuentran en un estado madurativo correspondiente al de un linfocito B del centro germinal que ha sufrido reordenamientos no funcionales de los genes de Igs, y que debería por tanto, ser destruido. Gracias a las señales de supervivencia y de crecimiento producidas por el EBV y en ausencia de una respuesta celular T eficaz, estas células son capaces de evadir el control del sistema inmunitario y dar origen a células tumorales (Timms et al., 2003).

(5) *Tumores asociados al VEB en pacientes que viven con VIH*

La patología asociada al VEB en los PVV es muy amplia y comprende procesos benignos, como la conocida leucoplasia oral vellosa (Greenspan et al., 1985) o la neumonitis intersticial linfoide, más frecuente en niños (Barberà et al., 1992; Travis et al., 1992). Sin embargo, la importancia del VEB en el contexto de la infección VIH está determinada por su asociación frecuente con procesos malignos, fundamentalmente linfomas y tumores de músculo liso (Tabla 6).

---

<b>Benignas</b>
Hiperplasia folicular (nódulo linfático, tracto intestinal)
Hiperplasia linfoide pulmonar o neumonitis intersticial linfoide
Desórdenes proliferativos polimorfos de células B policlonales
<b>Malignas</b>
Linfomas no Hodgkin
Linfomas Hodgkin
Leucemia aguda linfoblástica de célula B
Linfoma MALT (afectando pulmón, amígdalas, glándula salivar)
Leiomiocarcinoma

---

**Tabla 6. Patología benigna y maligna asociada al VEB en pacientes VVI.**  
Abreviaturas: MALT: *mucosal-associated lymphoid tissue*

Los PVV tienen un riesgo aumentado de padecer procesos linfoproliferativos con respecto a la población general y los linfomas representan la primera causa de muerte de origen neoplásico en esta población (Grulich et al., 2007; Hernández-Ramírez et al., 2017).

El LH clásico es el tumor más frecuente entre los tumores no definitorios de SIDA (Deeken et al., 2012), siendo la celularidad mixta el subtipo más frecuente. El LH suele aparecer en pacientes con una inmunodepresión moderada, y su incidencia no ha disminuido en los últimos años (Gotti et al., 2013). En los pacientes PVV está asociado casi invariablemente al VEB y se caracteriza por un curso clínico agresivo y la afectación extranodal.

Los linfomas no hodgkinianos (LNH) son los tumores definatorios de SIDA más frecuentes y su asociación con el VEB es variable en función del tipo de tumor (Biggar et al., 2007) (Tabla 5). El linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC) constituye uno de los linfomas típicamente asociado al VEB (60-100% de los casos) y es característico de pacientes gravemente inmunodeprimidos ( $CD4 < 100$  células/ $\mu$ L) (MacMahon et al.). Su incidencia disminuyó drásticamente con el advenimiento del tratamiento antirretroviral (ARV) y la consecuente mejora del estatus inmunológico de los PVV (Diamond et al., 2006). En la actualidad el LPSNC representa menos de un 1% de los LNH, siendo el linfoma difuso de células B grandes (LDCGB) y el LB, los LNH más frecuentes (75% y 25% respectivamente). Ambos suelen aparecer en pacientes moderadamente inmunodeprimidos ( $CD4 > 200$  células/ $\mu$ L) y su incidencia, al contrario que el LPSNC, no ha disminuido significativamente en los últimos años (Hleyhel et al., 2013). La asociación con el VEB es elevada en el caso del LDCGB (80%) y menos constante en el caso del LB (30-40%).

Los mecanismos que favorecen la aparición de linfomas asociados al VEB en los PVV están relacionados con la inmunodepresión y la hiperactivación linfocitaria de células B (Petrara et al., 2013). En los pacientes VVI, la respuesta citotóxica contra el VEB esta disminuida y se ha descrito una disminución de la producción de  $INF-\gamma$  en respuesta a antígenos virales del VEB. Por otro lado, la hiperestimulación del compartimento B, secundaria a la presencia de antígenos del VIH y productos derivados de la traslocación bacteriana, favorece la expansión y *turn-over* de las células B infectadas por el VEB. Estos linfocitos podrían sufrir mas fácilmente mutaciones debido a la sobrestimulación de la enzima AID (Epeldegui et al., 2007). La ausencia de una respuesta T eficaz junto con el aumento de citoquinas proinflamatorias, frecuente en los PVV, facilitaría la supervivencia y proliferación de los linfocitos B defectivos (Petrara et al., 2013).

En la actualidad, otros mecanismos ligados intrínsecamente con la infección VIH han sido implicados en la oncogénesis. Por ejemplo, algunas de las proteínas liberadas por las células infectadas por el VIH poseen propiedades oncogénicas *per se*. Es el caso de la proteína soluble Tat, que puede ser incorporada por los linfocitos B y ejercer un efecto inhibitorio sobre el gen oncosupresor Rb2/p130 (Bellan et al., 2003). La proteína Tat también podría favorecer la linfogénesis a través del aumento de la actividad angiogénica, al estimular los factores de crecimiento vascular y fibroblástico (Chirivi et al., 1999).

En cuanto a la acción sinérgica del VEB y las proteínas virales del VIH, se ha descrito que el VEB puede estimular la expresión del receptor CXCR2 en el linfocito B, receptor conocido de la IL-8 (Caccuri et al., 2012). La interacción entre el receptor CXCR2 y la proteína de la matriz P17 del VIH (abundante en el tejido nodal y extranodal de los nódulos linfáticos) estimula el crecimiento de las células B y puede favorecer la aparición de alteraciones genéticas a través de la activación de vías de señalización intracelular (Caccuri et al., 2014). A su vez, la proteína p17 puede estimular la expresión de la LMP-1, la oncoproteína estrella del VEB, creando un círculo vicioso de retroalimentación entre ambos virus (Figura 7) (Martorelli et al., 2015; Dolcetti et al., 2016).

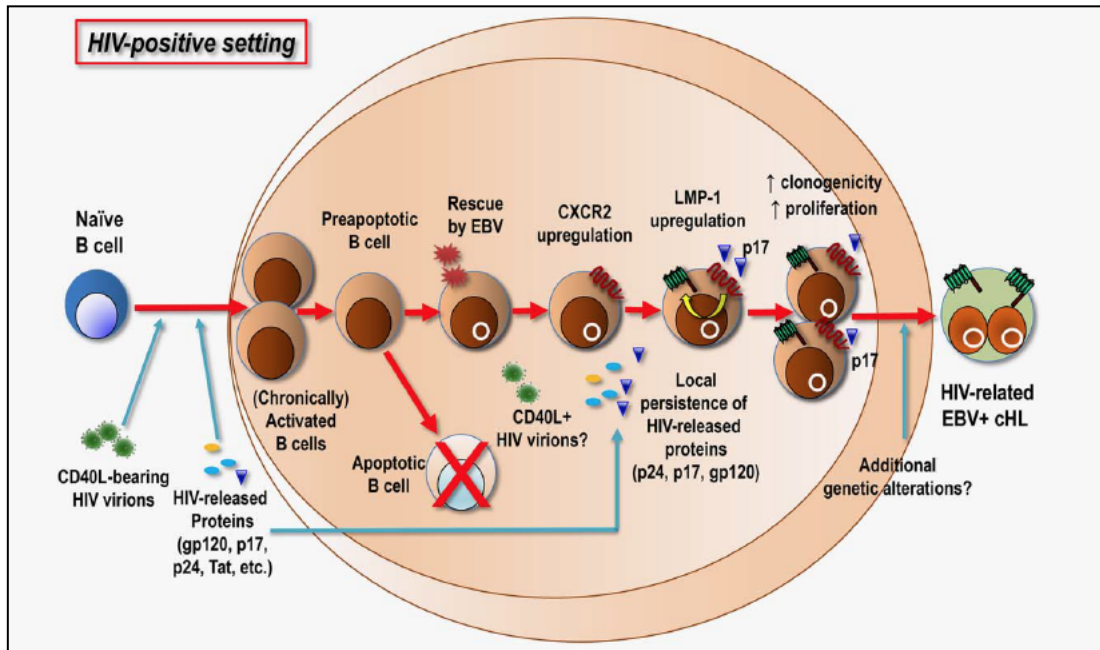


Figura 7. Modelo de la patogénesis del Linfoma Hodgkin clásico en los pacientes infectados por el VIH. Figura tomada de la referencia Dolcetti et al., 2016

c) Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes son el resultado de una respuesta inmune anormal contra antígenos propios o autoantígenos. Numerosos factores, genéticos y medioambientales participan en la etiopatogénesis de estas enfermedades, aunque la mayoría de ellos son todavía desconocidos. Los linfocitos B desempeñan un rol central en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes a través de la producción de autoanticuerpos y formación de inmunocomplejos, que desencadenan una respuesta inflamatoria y daño orgánico secundario (Browning, 2006). En condiciones fisiológicas, más de la mitad de linfocitos B que abandonan la médula ósea, poseen reordenamientos de los genes de las Igs que les permite reaccionar contra antígenos propios. La selección de linfocitos B y la destrucción de linfocitos B autorreactivos se lleva a cabo en los tejidos linfoides periféricos, precisamente en el centro germinal, gracias a los estímulos recibidos tras la interacción del receptor de linfocito B (BCR) con su ligando. Los linfocitos que



disponen de un BCR de alta afinidad son seleccionados mientras que el resto son eliminados (Lam and Rajewsky, 1998; Oropallo and Cerutti, 2014; Melchers, 2015).

Debido a su capacidad de producir una infección crónica en el linfocito B y sus propiedades relacionadas con el crecimiento y supervivencia celular, la infección por el VEB, se ha implicado como un posible factor de riesgo de numerosas enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, el Síndrome de Sjogren o la esclerosis múltiple (Draborg et al., 2013). Los pacientes que padecen estas enfermedades suelen presentar niveles elevados de anticuerpos contra el VEB, y se ha demostrado que algunas de las proteínas codificadas por VEB presentan una homología importante con proteínas propias, como ocurre en el caso de ciertos antígenos sinoviales en la artritis reumatoide (Draborg et al., 2013). Por otro lado, gracias a las proteínas codificadas por el VEB, los linfocitos autoreactivos, que normalmente deberían ser destruidos en tejidos periféricos, podrían recibir las señales necesarias para sobrevivir y generar autoanticuerpos (Draborg et al., 2013).

La infección por el VEB y el hábito tabáquico han sido identificados como los dos factores de riesgo más importantes de la esclerosis múltiple y se calcula que los pacientes que han sufrido una mononucleosis infecciosa tienen un riesgo 20 veces superior de desarrollar la enfermedad que los que no la han padecido (Belbasis et al., 2015; Handel et al., 2010). El mecanismo patogénico del VEB en la esclerosis múltiple sigue siendo desconocido, pero se especula que podría ser el resultado de la acumulación de linfocitos B infectados en el sistema nervioso central debido a un control deficiente de la infección por el VEB. Se cree que las células infectadas por el VEB desencadenarían una respuesta inflamatoria asociada a un daño tisular y que los brotes podrían ser consecuencia de la

acción del sistema inmune en respuesta a la reactivación del VEB (Fernández-Menéndez et al., 2016).

## B. NIÑOS EXPUESTOS NO INFECTADOS POR EL VIH

Gracias a la expansión de los programas de prevención de la transmisión madre-hijo del VIH, la tasa de transmisión vertical del VIH ha disminuido drásticamente, dando paso a una población creciente de recién nacidos expuestos pero no infectados por el VIH (*HIV exposed uninfected*, HEU) (Evans et al., 2016; Sugandhi et al., 2013). El futuro y desarrollo de estos niños preocupa a autoridades gubernamentales y sanitarias internacionales, pero especialmente a los países más afectados por la epidemia de VIH. En algunos países de África Subsahariana, los niños HEU pueden llegar a representar hasta el 30% del total de recién nacidos (Filteau, 2009; Slogrove et al., 2016; WHO *UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic 2013*.)

Diferentes estudios muestran que los niños HEU tienen un mayor riesgo de morbimortalidad de causa infecciosa (Arikawa et al., 2016; Desmonde et al., 2016) y algunos sugieren que podrían sufrir un retraso del crecimiento (Rosala-Hallas et al., 2017) y del desarrollo neurocognitivo, con respecto a los niños no expuestos al VIH (McHenry et al., 2018; Springer et al., 2018).

La vulnerabilidad de los niños HEU esta incrementada por diversas razones, en parte ligadas a la exposición al VIH, pero también al contexto socioeconómico particular en el que suelen vivir sus madres (Arikawa et al., 2016). Entre los factores más relevantes, ajenos solo en cierta medida a la enfermedad materna, se encuentra la lactancia. Se sabe que las probabilidades de recibir una lactancia natural y completa son menores en los niños HEU con respecto a los niños nacidos de madres sanas (Arikawa et al., 2016).

En cuanto a los factores ligados a la infección VIH, se ha descrito que la exposición a antígenos del VIH procedentes de la madre produce una perturbación en el sistema

inmune del niño, que conduce a un aumento de ciertos parámetros inflamatorios (Dirajlal-Fargo et al., 2019; Ruck et al., 2016). Aunque se desconocen si estas alteraciones inmunológicas tienen consecuencias clínicas, se han evocado como una posible causa de la menor respuesta a ciertas vacunas objetivada en esta población (Dirajlal-Fargo et al., 2019; Weinberg et al., 2017). Por último, la exposición pre y post-natal al tratamiento ARV podría ser deletérea y se han descrito alteraciones en el crecimiento relacionadas con la exposición al lopinavir-ritonavir (Blanche et al., 2019) e incluso un riesgo aumentado de cáncer en relación a la exposición a la didanosina (Hleyhel et al., 2016).

El aumento de la morbilidad infecciosa en los niños HEU también se ha relacionado con la exposición a un mayor número de agentes infecciosos procedentes de la madre, debido a su estado de inmunodepresión (Arikawa et al., 2016). Las causas de morbimortalidad infecciosa en los niños HEU son similares a las de los niños no expuestos no infectados por el VIH (*HIV unexposed uninfected*, HUU), siendo fundamentalmente la neumonía, diarrea y sepsis (Slogrove et al., 2016). Sin embargo, estas infecciones suelen ser más severas en los niños HEU, con un riesgo mayor de hospitalización y mortalidad que la objetivada en niños HUU (Slogrove et al., 2016). Un estudio ha mostrado que los niños HEU tienen un mayor riesgo a las infecciones invasoras por *Streptococcus* del grupo B y grupo *pneumoniae* (Slogrove et al., 2017).

Pero los niños HEU no sólo están expuestos a un mayor número de agentes bacterianos, sino también virales (Slogrove et al., 2016). La transmisión de virus madre-hijo puede ocurrir *in útero*, durante el parto o la etapa postnatal, a través de la lactancia materna. Debido a la inmunodepresión y a la hiperactivación linfocitaria características de la infección VIH, el control de las infecciones crónicas virales, como las producidas por los

virus del grupo herpes (herpes simplex, citomegalovirus, VEB) o las hepatitis, está deteriorada en las personas infectadas por el VIH. Las reactivaciones son frecuentes en los PVV y el aumento de la replicación y la excreción viral a través de diferentes compartimentos podrían aumentar el riesgo de transmisión madre-hijo de ciertos virus (Ling et al., 2003; Gantt et al., 2016; Matrajt et al., 2017).

En este trabajo de tesis, nos interesamos por la transmisión perinatal de un virus de la familia herpes, el VEB, en un grupo de niños HEU nacidos en Uganda. A continuación detallamos los mecanismos que podrían aumentar la exposición al VEB en el contexto de la infección VIH materna, y en consecuencia, el riesgo de transmisión madre-hijo en los niños HEU. Debido a la relevancia de la interacción entre malaria y VEB en el África Subsahariana, y ser en esta región donde se lleva a cabo nuestro estudio, describimos brevemente los mecanismos por los que la malaria podría favorecer la adquisición precoz de este virus.

## **1. TRASMISIÓN PRECOZ DEL VEB Y VIH**

La adquisición precoz de la infección VEB en niños nacidos de madres VVI puede estar favorecida por diversos mecanismos, tanto maternos como infantiles.

Por un lado, los niños nacidos de madres VVI están probablemente expuestos a un inóculo infeccioso mayor que los niños no expuestos al VIH, debido al control deteriorado de la infección por el VEB en los pacientes VVI (Stevens et al., 2002; Ouedraogo et al., 2014; Petrara et al., 2012). Los PVV exhiben niveles de anticuerpos contra el VEB mayores que los pacientes no infectados por el VIH, indicativos de reactivaciones frecuentes (Stevens et al., 2002). La viremia del VEB es mayor en sangre periférica y saliva en PVV con respecto a pacientes seronegativos (Ling et al., 2003). Además, la carga viral del VEB esta aumentada

en PVV con viremia del VIH detectable y sus niveles se correlacionan con marcadores de activación del linfocito B y citoquinas proinflamatorias (Petrara et al., 2014). En las madres que viven con VIH, la excreción viral del VEB está incrementado en saliva (Matrajt et al., 2017) y aproximadamente el 50% presentan niveles detectables en la leche durante la lactancia (Sanosyan et al., 2016; Viljoen et al., 2015). La presencia del VEB no parece estar incrementada en secreciones vaginales de madres infectadas por VIH (Oliveira et al., 2011), aunque la infección congénita ha sido descrita en niños HEI (Gumbo et al., 2005).

Por otro lado, la transferencia de anticuerpos protectores vía trasplacentaria se encuentra comprometida en madres VVI (Jones et al., 2011) y podría constituir otro de los mecanismos favorecedores de la infección temprana por el VEB. Los anticuerpos, fundamentalmente de tipo IgG, atraviesan la barrera sincitio-trofoblástica gracias a los receptores FC de las Igs y son liberados en el endotelio de los capilares fetales. En las madres infectadas por el VIH o en aquellas que sufren malaria, o en otras situaciones que cursan con una hipergammaglobulinemia, el traspaso de anticuerpos de la madre al feto se encuentra perturbado (Okoko et al., 2001; Cumberland et al., 2007). La infección por VIH se ha asociado a una disminución significativa de la transferencia de anticuerpos IgG específicos contra el sarampión y la varicela (Isabel de Moraes-Pinto et al., 1996) o el tétanos (Reikie et al., 2013). La infección por el VEB raramente se produce antes de la desaparición de los anticuerpos maternos, por lo que probablemente éstos ejerzan un papel protector contra la infección (Biggar et al., 1978b; Piriou et al., 2012).

La contaminación vertical por VIH constituye igualmente un factor de riesgo para la adquisición precoz del VEB y se relaciona con un peor control de la infección. Los niños HEI infectan no sólo más precozmente sino que también muestran niveles del VEB en sangre periférica más elevados y durante más tiempo que los niños HEU (Brandt et al., 1998; Gantt

et al., 2016; Slyker et al., 2013). La excreción del VEB en la saliva de los niños HEI está incrementado con respecto a los HEU, especialmente en los niños más inmunodeprimidos (Jenson et al., 1999). Al igual que en los adultos, se ha podido determinar una asociación entre los niveles elevados de carga viral del VIH y del VEB y el efecto protector del tratamiento antiretroviral con respecto al reservorio del VEB (Petrara et al., 2014). Los niños HEI pueden también presentar una coinfección con ambos serotipos, el VEB 1 y 2 (Coleman et al., 2017).

## 2. TRASMISIÓN PRECOZ DEL VEB Y MALARIA

La infección por *P. falciparum* modula la epidemiología del VEB en el África ecuatorial, y en las regiones con un grado de endemidad alto a malaria, los niños tienen un riesgo aumentado de contaminación precoz por el VEB (Piriou et al., 2012; Rainey et al., 2007).

La infancia representa el período de mayor vulnerabilidad a la malaria. Los niños carecen de inmunidad específica contra el *P. falciparum* y es durante los primeros años de vida cuando sufren mayor número de infecciones y también las más graves (Snow et al., 1998). Los niños que viven en una región hiperendémica de malaria se contaminan precozmente y presentan cargas virales del VEB más elevadas que los niños que viven en regiones de baja endemia (Piriou et al., 2012). La infección por *P. falciparum* produce una alteración profunda en la respuesta inmunitaria contra el VEB, tanto en la respuesta celular como humoral (Donati et al., 2004). Durante la infección aguda por *P. falciparum* se han objetivado alteraciones en la respuesta celular T contra el VEB y un aumento de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-12, que a través de la activación del linfocito B, pueden contribuir al aumento del reservorio viral (Whittle et al., 1984). La respuesta T CD8 contra

los antígenos latentes medida por citometría de flujo, y la producción de INF- $\gamma$  en respuesta a los antígenos del VEB, aparece disminuida entre los niños de menor edad que padecen malaria (Chattopadhyay et al., 2013). Igualmente, la respuesta citotóxica es menor entre los niños procedentes de una región hiperendémica de malaria en comparación con los niños que viven en una región de baja endemia (Snider et al., 2012).

Por otro lado, la infección materna por malaria puede aumentar el nivel de exposición al VEB en los niños y favorecer la adquisición precoz. Diversos trabajos realizados por el equipo de Rochford R. llevados a cabo en Kenia, han demostrado que la malaria durante el embarazo puede desencadenar reactivaciones del VEB, con aumento de los niveles de ADN del VEB en sangre periférica y también de la excreción del VEB a través de la leche materna (Daud et al., 2014). La transferencia de anticuerpos protectores contra el VEB puede estar deteriorada en niños nacidos de madres con malaria, y este grupo puso en evidencia una disminución del nivel de anticuerpos IgG anti-VCA y EBNA en recién nacidos de madres con malaria en comparación con niños nacidos de madres sanas (Ogolla et al., 2015).



## IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### A. HIPÓTESIS

#### 1. Hipótesis conceptual

El riesgo de infección por el VEB está incrementado en los niños expuestos a un nivel mayor de virus procedente de sus madres. La situación inmunoviológica de las madres VVI influye en el grado de exposición al VEB, y las madres con un grado de inmunodepresión mayor (mayores niveles de carga viral de VIH y recuentos bajos de linfocitos T CD4) presentan más frecuentemente niveles detectables del VEB en plasma y leche.

#### 2. Hipótesis operativa.

El riesgo de adquisición del VEB durante el primer año de vida está aumentado en los niños HEU cuyas madres presenten niveles detectables del VEB en plasma y leche.

**B. OBJETIVOS**

**1. Objetivo principal**

Evaluar si la infección por el VEB en los niños HEU durante el primer año de vida se relaciona con la presencia de niveles detectables del ADN del VEB en plasma y leche maternos.

**2. Objetivos secundarios**

1. Evaluar la asociación entre los parámetros inmunoviroológicos maternos (recuento de linfocitos T CD4 y carga viral del VIH) y la presencia del ADN del VEB en el compartimento plasmático y mucoso (leche materna).

2. Evaluar la correlación entre los niveles de ADN del VEB en plasma y leche materna.

3. Determinar la incidencia de la infección por el VEB en los niños HEU durante el primer año de vida.

4. Evaluar si los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a la semana de vida difieren entre los niños que se infectan por el VEB durante el primer año frente a los que no se infectan.

5. Determinar si el control de la infección por el VEB en los niños HEU (niveles de ADN del VEB en el momento del diagnóstico) difiere entre los niños que se contaminan precozmente por el VEB (antes o en la semana 14 de vida).

6. Determinar si el control de la infección por el VEB en los niños HEU (pico máximo de los niveles de ADN del VEB) aumenta en los niños expuestos a la malaria (ADN del *P. falciparum* o *P. vivax* positivo).
7. Valorar si el riesgo de infección por el VEB difiere según el régimen profiláctico ARV administrado a los niños (lamivudina versus lopinavir-ritonavir).
8. Determinar si el control de la infección por el VEB en los niños (pico virémico del VEB) puede estar influido por el régimen profiláctico ARV recibido.
9. Evaluar si el control de la infección por el VEB en los niños HEU está deteriorado entre los niños que presentan eventos adversos graves durante el seguimiento.
10. Evaluar si la infección por el VEB durante el primer año de vida tiene consecuencias clínicas o en el crecimiento de los niños HEU.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### A. DISEÑO

Para alcanzar los objetivos previamente enumerados, se ha diseñado un estudio observacional longitudinal, en una cohorte de parejas de madres que viven con VIH y niños HEU incluida en el ensayo clínico ANRS 12174 (NCT00640263). Nuestro estudio forma parte de uno de los estudios ancilares propuestos al comité científico del ensayo ANRS 12174 en el año 2014.

#### 1. Estudio ANRS 12174

El estudio ANRS 12174 fue un ensayo clínico multicéntrico, randomizado, doble ciego, que comparaba la eficacia de una profilaxis ARV administrada a los niños, con el fin de reducir la transmisión vertical del VIH durante la lactancia (Nagot et al., 2016). Aproximadamente 1273 parejas de madres-niños participaron en este estudio que se llevó a cabo en centros de cuatro países africanos: Sudáfrica, Uganda, Zambia y Burkina Faso, entre los años 2009 y 2011. En aquella época, el tratamiento universal (opción B+) todavía no era recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la indicación de la triple terapia se restringía a las madres con recuentos de linfocitos CD4 < 350 células/mL o con una indicación clínica (Chersich et al., 2018). Las madres infectadas por VIH incluidas en este ensayo no requerían tratamiento ARV, pero recibían una profilaxis durante el embarazo y el parto según las recomendaciones de cada país (zidovudina a partir de la semana 28 de embarazo, Combivir® y nevirapina oral durante el parto y Combivir® una semana después, y nevirapina al recién nacido durante 1 semana). Una vez descartada la infección congénita por VIH en el niño, se procedía a la inclusión de las parejas madre-hijo

en el ensayo clínico (día 7±2 postparto). Los niños eran randomizados 1:1 para recibir una profilaxis ARV a base de lopinavir-ritonavir o de lamivudina. Durante el estudio, se recomendaba a las madres amamantar a sus hijos durante los 6 primeros meses de vida de forma exclusiva, y diversificar progresivamente la alimentación hasta la interrupción total de la lactancia en la semana 49.

## 2. **Consideraciones éticas**

El estudio ANRS 12174 fue conducido de acuerdo a las directivas éticas del promotor (Agencia nacional de investigación del VIH y hepatitis víricas: ANRS) y tras ser aprobado por los respectivos comités éticos de los departamentos de investigación clínica de los centros participantes. Las madres dispuestas a participar en el ensayo clínico consentían a través de un consentimiento informado escrito en lengua vernácula y recibían una copia del mismo. Nuestro estudio fue propuesto y aprobado en sesión plenaria por el comité científico del ensayo ANRS 12174 en abril del 2014.

Los experimentos realizados en un pequeño número de muestras de niños franceses disponibles en el laboratorio de virología del Hospital Universitario de Montpellier fueron utilizados según la normativa del centro. La utilización de muestras almacenadas en los laboratorios clínicos del hospital se puede realizar previa autorización expresa de los representantes legales y/o pacientes a través de un consentimiento informado.

### 3. **Ámbito del estudio**

El ensayo clínico ANRS 12174 se realizó en los centros hospitalarios de cuatro países africanos, entre ellos el hospital regional de Mbale, en Uganda. Las muestras utilizadas en nuestro estudio pertenecen a la cohorte de madres y niños reclutada en este país.

La ciudad de Mbale se encuentra a 300 km de la capital Kampala, al este del país. La ciudad esta situada a una altura media de 1.156 metros sobre el nivel del mar y dista 57 km del monte Elgon, un volcán extinto y uno de los picos más altos del África oriental. Su clima equivale a la llamada sabana sudanesa oriental y en la proximidad con las montañas, selva montañosa (<https://en.wikipedia.org/wiki/Mbale>).

Mbale es la capital del distrito del mismo nombre y cuenta con 96,189 habitantes. La mayoría de la población es rural y se dedica fundamentalmente a la agricultura (café, habas, maíz, etc.). Su población esta constituida principalmente por individuos de la tribu Bamasaba y Bagisu, que utilizan el Lugisu como idioma principal (<https://en.wikipedia.org/wiki/Mbale>).



**Figura 8. Hospital de Mbale. Cortesía del equipo ANRS 12174**

El hospital regional de Mbale es un hospital público y gratuito fundado por el Ministerio Ugandés de Salud, y es el centro de referencia del distrito de Mbale y demás distritos colindantes. El hospital es uno de los 13 hospitales universitarios ugandeses en el que se dispensa formación a residentes ([https://en.wikipedia.org/wiki/Mbale\\_Hospital](https://en.wikipedia.org/wiki/Mbale_Hospital)).

#### **4. Epidemiología del VIH en Uganda**

Con una población de en torno 40 millones de habitantes, se calcula que casi un millón y medio de personas viven con VIH en Uganda (<https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/uganda>). La prevalencia en adultos es de alrededor del 5.7% y la incidencia de 1.4 por 1000 personas no infectadas de todas las edades. En este país, se diagnostican 53.000 nuevas infecciones al año y 23.000 muertes están relacionadas con enfermedades ligadas al VIH. Por debajo de los objetivos fijados por la OMS para el año 2020 (90–90–90), el 81% de los PVV en Uganda reciben tratamiento ARV y 73% presentan una infección controlada con carga viral del VIH indetectable.

Entre los PVV, 60% son mujeres, y el número de mujeres infectadas entre los 15 y 24 años es más del doble que el de hombres del mismo rango de edad (14.000 versus 5.000).

La tasa de transmisión VIH madre-hijo es una de las más bajas de continente africano (7.39%, IC: 5.86-9.55) y en 2019 se calculó que la población de niños HEU se elevaba a 1.100.000 niños (940.000 – 1.200.000) ([https://aidsinfo.unaids.org/elimination of mother to child transmission HIV/HIV-exposed children who are uninfected](https://aidsinfo.unaids.org/elimination-of-mother-to-child-transmission-HIV/HIV-exposed-children-who-are-uninfected)). La mayoría de las mujeres embarazadas (93%) reciben tratamiento ARV durante el embarazo, y se calcula que cerca de 17.000 nuevas infecciones fueron evitadas gracias al mismo en 2018.

### 5. Epidemiología de la malaria en Uganda

La malaria sigue representando en la actualidad una de las causas más importantes de morbimortalidad en Uganda. En este país, el número de casos al año es muy elevado, entre 8 a 13 millones. La tasa de ingreso hospitalario es del 35% aproximadamente, con una tasa de mortalidad del 9-14%, sin contar las muertes extrahospitalarias. Según el informe mundial de la malaria del año 2008, Uganda ocupa el tercer puesto de países con mayor número de muertes debido a la malaria (~50.000), por detrás de Nigeria y República Democrática del Congo. La mayoría de estas muertes se producen en niños menores de 5 años (Yeka et al., 2012).

El 95% de las infecciones de malaria en Uganda son por *P. falciparum* y el 5% se deben a otras especies (2% *P. vivax*, 2% *P. malariae*, y <1% *P. ovale* y 3% de infecciones mixtas) (Yeka et al., 2012).

En la mayoría del país, la transmisión se considera estable, con un nivel de endemidad elevado (Figura 9) (Yeka et al., 2012). El área geográfica correspondiente a nuestro estudio se considera como una región de baja-media endemia.



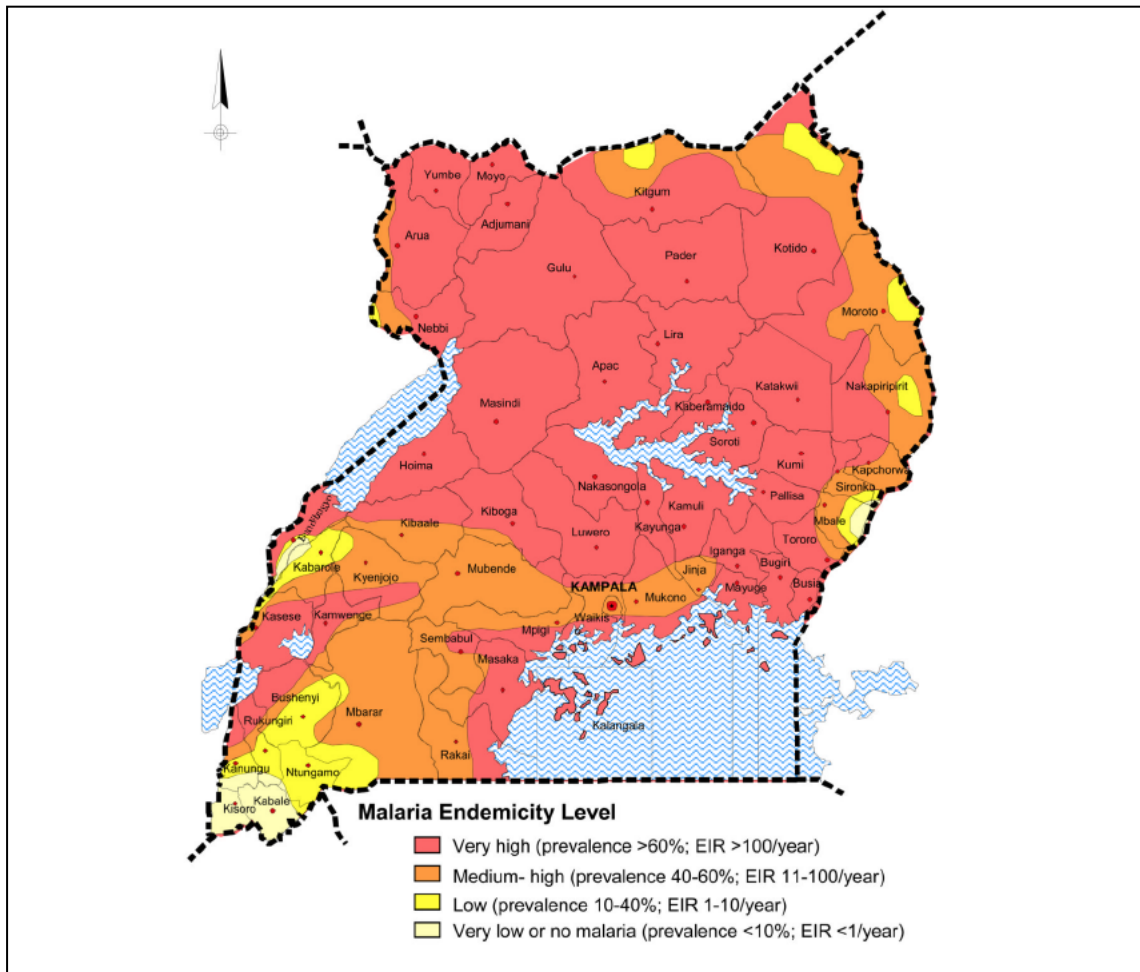


Figura 9. Representación del grado de endemicidad de malaria en Uganda. Imagen tomada de la referencia Yeka et al., 2012.

## B. SELECCIÓN DE LA COHORTE

La población de madres-niños procedentes del centro ugandés fue seleccionada para nuestro estudio por ser la única cuya bioteca se encontraba disponible en la Unidad de Investigación INSERM 1058 de Montpellier en el año 2014.

### 1. Criterios de inclusión.

- Niños expuestos no infectados por el VIH en la primera visita del ensayo clínico ANRS 12174 (día 7±2 postparto).
- Muestras disponibles en la Unidad de Investigación INSERM 1058 de Montpellier, Francia.
  - Niños: muestras de papel secante (Dried Blood Spot: DBS) a día 7±2 (semana 1), semana 6, 14, 26, 38 y 50 postparto.
  - Madres: muestras de plasma y de leche materna (sedimento celular) de seno izquierdo y derecho a día 7±2 (semana 1) postparto.
  -

### 2. Criterios de exclusión:

- Niños infectados por VIH durante el primer año de vida.

C. MATERIALES

En la siguiente figura, se representa de manera esquemática el conjunto de muestras utilizadas en nuestro estudio, el momento de su colección y los análisis realizados para alcanzar nuestros objetivos (Figura 10).

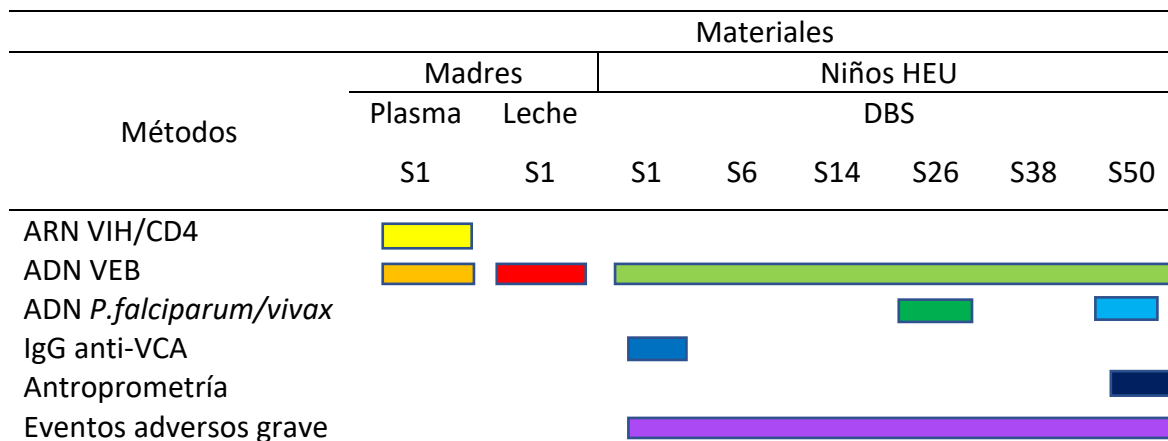


Figura 10. Materiales y métodos empleados durante el estudio

La colección materna correspondía al conjunto de muestras de plasma y leche recogidas en la visita de selección del estudio ANRS 12174 (día 7±2 postparto o semana 1). Estas muestras fueron almacenadas localmente a -80 °C y posteriormente enviadas a la Unidad Inserm 1058 de Montpellier. Las muestras de leche materna se obtenían de la expresión manual de ambos senos y se recogían en tubos cónicos de 50 mL de capacidad. Para separar la fracción celular y la serosa (lactoserum o lactosuero) se centrifugaban durante 5 minutos a 5000 revoluciones por minuto. Las alícuotas de lactosuero eran conservadas a -80 °C hasta su utilización. Los parámetros inmunovirológicos basales de las madres (niveles de linfocitos T CD4 y carga viral del VIH) fueron obtenidos de la base de datos del ensayo ANRS 12174. Los niveles maternos de ARN del VIH en plasma habían sido

cuantificados a través del test genérico de carga viral del VIH (Biocentric, Bandol, France) cuyo límite de detección era de 300 copias/mL (Rouet et al., 2005; Viljoen et al., 2010).

Las muestras utilizadas en los niños correspondían a muestras de sangre capilar obtenida de la punción del talón y recogidas sobre papel secante o DBS (Kit DBS 50 NN, Biocentric) a la semana 1 (día  $7\pm 2$ ), semana 6, 14, 26, 38 y 50 posparto. Cada carta poseía 5 *spots*, correspondiente a un volumen aproximado de 250  $\mu$ L de sangre (50  $\mu$ L por *spot*). Las muestras DBS se dejaban secar durante una noche a temperatura ambiente y posteriormente eran almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### D. MÉTODOS

#### 1. Diagnóstico de la infección por el VEB en los niños a la semana 50

El diagnóstico de la infección por el VEB en los niños se basó en la detección de los anticuerpos IgG anti-VCA en muestras DBS a la semana 50 de vida. La detección de anticuerpos IgG anti-VCA se realizó en las 201 muestras de plasma maternas y DBS de los niños mediante una técnica de inmunoensayo automatizada siguiendo las recomendaciones del fabricante (LIAISON<sup>®</sup> VCA IgG, DiaSorin, Saluggia, Italy). Los resultados en las muestras DBS se expresaron en forma de un índice: valor en unidades internacionales por mL (IU/mL) dividido entre el umbral positivo o suelo de detección. El suelo de detección se calculó como la media de los valores negativos más 3 desviaciones standard (DS) de la media negativa (1382,60). En las muestras de plasma materno, el resultado obtenido fue únicamente cualitativo (positivo o negativo).

A continuación, se detalla el procedimiento utilizado para validar la serología del VEB en muestras DBS.

a) **Validación de la serología del VEB en muestras DBS**

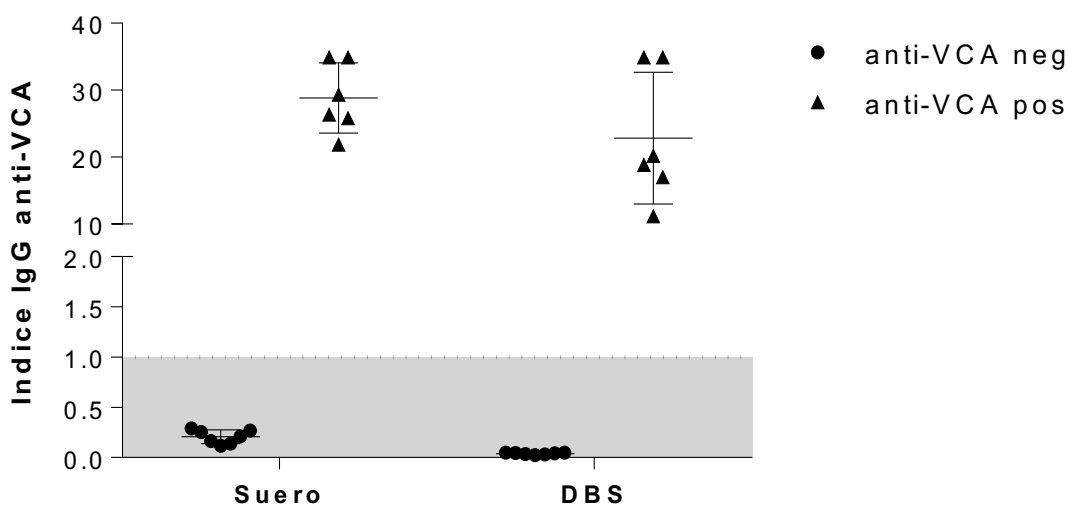
La cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-VCA se llevó a cabo en muestras de suero y DBS de 13 niños de aproximadamente un año de edad cuyas muestras se encontraban disponibles en el laboratorio de virología del hospital de Montpellier. Para este experimento nos servimos del suero restante (no utilizado) de los fondos de tubo.

Nuestro objetivo consistía en confirmar que la cuantificación de anticuerpos IgG anti-VCA era concordante en muestras de suero y DBS. Para fabricar una muestra equivalente a la sangre capilar utilizada en las tarjetas DBS, nos servimos de la mezcla constituida por el suero de las muestras disponibles y de glóbulos rojos en una proporción de 60/40 (respetando la proporción suero/glóbulos rojos en sangre total). Los glóbulos rojos fueron obtenidos tras centrifugación de muestras de sangre total (separación del componente celular y suero) procedentes de pacientes con serología conocida negativa del VEB (ausencia de anticuerpos IgG anti-VCA y anti-EBNA). Esta mezcla fue la utilizada para imbuir los *spots* de DBS, con una cantidad de 30-50  $\mu\text{L}$  por *spot*. Gracias a tijeras perforantes especiales se obtenían *spots* de 3 mm de diámetro. Dos *spots* (6 mm) por niño fueron eluidos en 100  $\mu\text{L}$  de solución fosfato buffer y sometidos a agitación durante 18 horas a temperatura ambiente.

En líneas generales, se considera que las muestras DBS están diluidas con respecto al suero a razón de 1/20 (60  $\mu\text{L}$  de DBS corresponden a 3  $\mu\text{L}$  de suero). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la muestra debía diluirse a razón de 1/101 con el diluyente del kit. En el caso del suero, diluimos 5  $\mu\text{L}$  de suero en 500  $\mu\text{L}$  de diluyente. En el caso de la muestra DBS: Si 60  $\mu\text{L}$  de DBS corresponden a 3  $\mu\text{L}$  de suero, la adición de 240  $\mu\text{L}$  de diluyente nos permitió la obtención de la dilución necesaria ( $3/240+60= 3/300= 1/100$ ).

Los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA en las muestras de suero y DBS fueron analizados a través del autómata LIASON XL Liaison DiaSorin siguiendo las instrucciones previas. Los resultados obtenidos en el suero de los niños fueron considerados como los niveles de referencia y comparados con los obtenidos en las muestras DBS fabricadas.

Los anticuerpos IgG anti-VCA fueron detectados en los sueros de seis niños. Los otros siete niños presentaban un nivel de anticuerpos por debajo del límite de detección del fabricante. Los resultados obtenidos en las muestras DBS eran concordantes con los obtenidos en las muestras de suero (Figura 11).



**Figura 11. Validación de la cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA en muestras DBS**  
Las barras representan la media y la desviación estándar de los índices de anticuerpos IgG anti-VCA agrupados por tipo de muestra (suero o DBS) y resultado positivo o negativo.

b) **Trasferencia de anticuerpos maternos**

Los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA fueron cuantificados en un subgrupo de 150 niños a la semana 1 postparto.

En una muestra aleatoria de 10 niños se cuantificó de manera longitudinal los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a la semana 1, 6, 14, 26, 38 y 50.

2. **Cuantificación del ADN del VEB en muestras DBS de niños y plasma/leche materna**

La cuantificación del ADN del VEB en las muestras DBS se llevó a cabo de forma secuencial en las semanas 1, 6, 14, 26, 38 y 50. Esta determinación se efectuó únicamente en los 87 niños que mostraron una serología positiva al VEB a la semana 50.

Por cada DBS, dos discos de 3 mm de diámetro (aproximadamente 25 µL de sangre) fueron recogidos en tubos de 1.5 mL. La elución y lisis de ácidos nucleicos se llevó a cabo en 200 µL de diluyente siguiendo el método descrito en la referencia (Viljoen et al., 2010). Para la extracción del ADN del VEB se utilizó el autómata QIAamp DNA Mini QIAcube Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Germany). Los controles negativos fueron incluidos después de cada extracción y la calidad del ADN extraído fue evaluada por un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

El mismo kit y el mismo volumen (200µL) fueron utilizado para cuantificar el ADN del VEB en 197 muestras de plasma y 188 de leche materna recogidas a la semana 1 postparto.

La amplificación del ADN del VEB se realizó usando *primers* y pruebas designadas para detectar la secuencia de 70 pares de bases del gen *BXLF-1* del genoma viral a través

de un test comercial (EBV R-gene™, Argene, Biomerieux, France) usando el gen de la  $\beta$  globina como control del *input* de ADN.

Los resultados fueron expresados como copias de ADN del VEB por millón de células (copias/10<sup>6</sup> células) en las muestras DBS y en copias/mL en las muestras de plasma y leche materna. El número de células humanas fue cuantificado en base a la detección de  $\beta$  globina por qPCR (Orozco et al., 2008). El límite de la detección del kit R-gene EBV™ era de 182 copias/mL según el fabricante (Fafi-Kremer et al., 2008) y de 500 copias/mL en sangre total.

El nivel más elevado de ADN del VEB detectado en los niños en muestras DBS durante el seguimiento fue considerado como el pico virémico.

### 3. Exposición a la malaria

La exposición a la malaria se determinó a través de la detección del ADN de *P. falciparum* y *P. vivax* en muestras DBS a la semana 26 y 50, en 177 y 198 niños respectivamente. La extracción del ADN del *P. falciparum* y el *P. vivax* se realizó según el método utilizado para la extracción del ADN del VEB. La cuantificación de ADN de *P. falciparum* y de *P. vivax* se llevó a cabo a través de una PCR anidada (Bharti et al., 2012). La primera ronda de la PCR amplifica los *Plasmodium* genus (CCTGTTGTTGCCTTAACTTC y TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG) y con la segunda se identifica el subtipo (*i.e.* *P. falciparum* (TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT y ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC) o *P. vivax*(CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC yACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA). Cada una de las series de muestras contiene un control positivo y negativo y el resultado es obtenido de la migración del producto de la PCR en un gel de agarosa y tinción con Bromuro de etidio (Bharti et al., 2012).



#### 4. Evaluación clínica y eventos adversos graves

Durante las visitas clínicas programadas en el ensayo clínico ANRS 12174 (a partir de la segunda semana de vida y cada cuatro semanas hasta la semana 50), se procedía a un examen general del bebé, que incluía la exploración física, toma de constantes y medidas antropométricas. La anamnesis dirigida a la madres permitía identificar la aparición de enfermedades intercurrentes o eventos secundarios que pudieran estar relacionados con el tratamiento del estudio.

El peso y la altura eran medidos dos veces por visita según las guías desarrolladas por la OMS (WHO child growth standards and the free WHO program, 2009 (<http://www.who.int/childgrowth/training/en/>)).

Los parámetros antropométricos recogidos en el ensayo fueron el peso para la longitud (P/L), peso para la edad (P/E) y longitud para la edad (L/E) y se expresaban en forma de razón estandarizada (*Z score*). Los parámetros P/L, P/E y L/E eran considerados moderada o gravemente anormales cuando el *Z score* era inferior a -2 DS de la normal establecida para una población de la misma edad. Los valores *Z scores* a la semana 50 de vida estaban disponibles en un subgrupo de 158 niños participantes en el ensayo clínico ANRS 12174.

Con respecto a la edad gestacional, se consideró un nacimiento a término a partir de la semana 37 de gestación ( $\geq 37$  semana) y pretérmino (baja edad gestacional) si se producía antes de la 37 semana.

Los eventos adversos considerados graves (grado 3 o 4) según las tablas elaboradas por la División sobre el SIDA del Instituto Nacional de Salud Americano (DAIDS adverse events grading tables version 2.0, November 2014) fueron registrados en todo momento a

lo largo del seguimiento del ensayo clínico. Estas tablas permiten clasificar los eventos adversos en una escala del 1 al 5, con la descripción general siguiente:

- Grado 1: evento leve
- Grado 2: moderado
- Grado 3: grave
- Grado 4: evento potencialmente mortal
- Grado 5: muerte

Para este estudio, clasificamos los eventos adversos graves (EAG) registrados en la base de datos del estudio ANRS 12174 en biológicos y clínicos. Las alteraciones analíticas fueron consideradas EAG biológicos (p.ej. anemia) y las enfermedades intercurrentes o síndromes clínicos (p.ej. neumonía) como EAG clínicos. La infección por malaria también fue considerada como un EAG clínico (diagnóstico clínico y microbiológico - gota gruesa-compatible).

### E. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La incidencia acumulada de la infección por el VEB fue calculada según el método Kaplan–Meier. Las características entre los niños HEU infectados a la semana 50 por el VEB y los niños no infectados fueron comparadas utilizando el test  $\chi^2$  para las variables categóricas o el test de Fisher cuando el número era insuficiente. Las variables continuas fueron estudiadas según el test de Student si la distribución de los valores seguía la distribución normal o el test de Wilcoxon Mann–Whitney, si era no normal. Los niveles del ADN del VEB y del ARN del VIH fueron transformados en logaritmos y las cargas indetectables en logaritmos 0 para llevar a cabo los análisis. Todas las pruebas fueron de dos colas con un nivel de significación *alpha* del .05.

La correlación de Spearman's rank fue utilizada para describir la correlación entre los valores de ADN del VEB en la leche y el plasma materno.

Se construyó un modelo de regresión logística con selección retrógrada (*backward*) para identificar los factores maternos e infantiles asociados a la infección por el VEB en los niños HEU a la semana 50. Las variables incluidas en el análisis multivariado fueron aquellas que presentaban un valor *P* inferior a .20 en el análisis univariado.

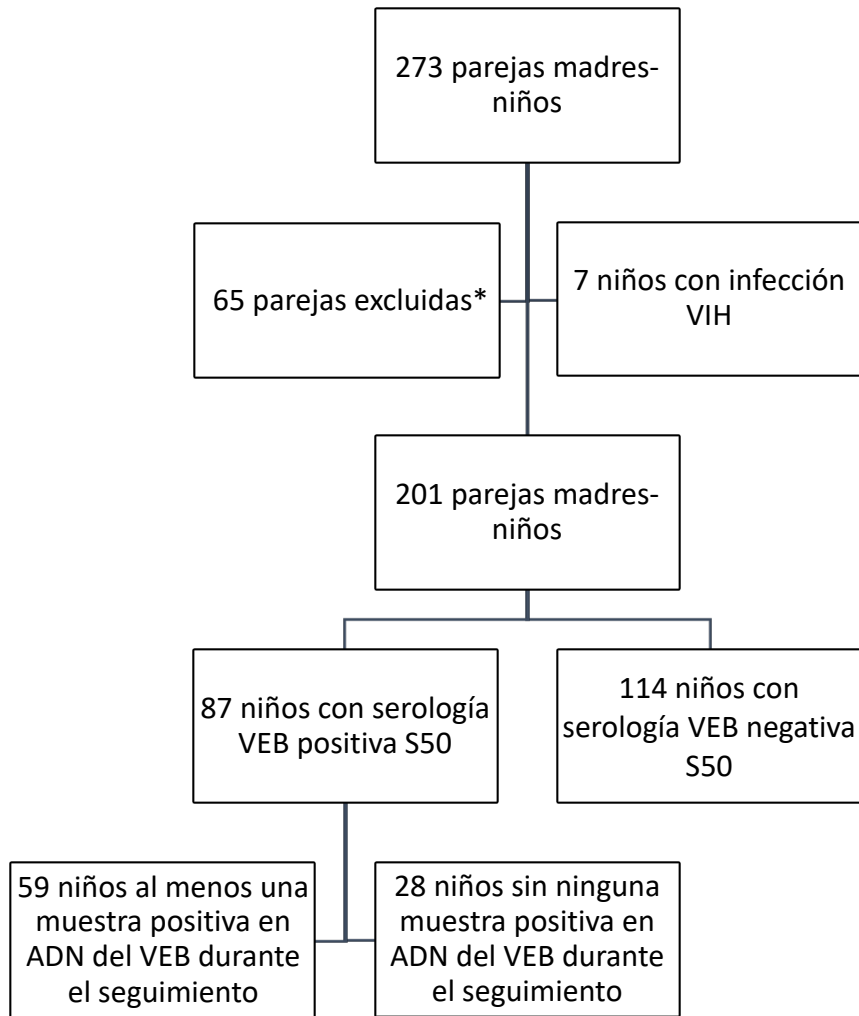
Los factores de riesgo asociados a la presencia del ADN del VEB en leche materna y a la alteración del parámetro de crecimiento P/L (*Z score* < -2 DS) a la semana 50 fueron igualmente estudiados a través de modelos de regresión logística con selección retrógrada. Las variables incluidas en estos modelos fueron aquellas que se asociaban con la variable dependiente de forma significativa en el modelo univariado (*P* < .20). En el caso del modelo construido para evaluar los factores asociados a la alteración del parámetro antropométrico P/L, se incluyó la variable profilaxis ARV recibida por los niños a pesar de presentar una asociación no significativa en el análisis univariado (*P* > .20). La razón fue que nuestro grupo ha descrito recientemente una asociación entre el tratamiento a base de lopinavir-ritonavir y una alteración en el crecimiento de niños participantes en el ensayo ANRS 12174 (Blanche et al., 2019).

Los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados mediante los programas IBM SPSS statistics 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) respectivamente.

## VI. RESULTADOS

### A. Selección de las parejas madre-niño incluidas en el estudio

En la Figura 12, se presenta un diagrama de flujo que resume el proceso de selección de los pacientes del estudio. A partir de un total de 278 parejas madre-niño incluidas en Uganda en el ensayo clínico ANRS 12174, seleccionamos aquellas (208) cuya bioteca estaba disponible en la Unidad de Investigación de Montpellier en el momento de iniciar el estudio. Siete parejas adicionales fueron excluidas al confirmar una contaminación vertical del VIH a lo largo del seguimiento. Las características basales sociodemográficas y biológicas fueron comparadas entre las parejas de madres-niños incluidas y no incluidas en el estudio sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.



**Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de selección de las parejas madres-niños e identificación de los niños infectados por el VEB**

\* Visitas perdidas o con muestras no disponibles

**B. Características basales de las parejas madre-niño incluidas**

A continuación, mostramos las características generales de las parejas madre-hijo incluidas en el estudio (Tabla 7). En relación con la situación inmunoviológica, el 90% de las madres incluidas presentaban un estadio clínico 1 según la clasificación por estadios clínicos de la OMS (Interim WHO clinical staging of HIV/AIDS, World Health Organization, 2005). El recuento medio de linfocitos CD4 era de 525 células/ $\mu$ L (rango intercuartílico, RIQ: 436-624) y más de la mitad de las madres (66%) presentaban niveles plasmático de ARN del VIH indetectables a la semana 1 postparto. Cerca del 80% de las madres se habían beneficiado de un tratamiento ARV profiláctico durante el embarazo según las recomendaciones de la época y más del 90% habían recibido una profilaxis intraparto. En cuanto al nivel de educación, más de la mitad de las madres habían completado estudios de primaria y aproximadamente un tercio habían realizado estudios superiores (educación secundaria o terciaria). Las madres incluidas tenían una media de 3 hijos (Tabla 7).

Con respecto a las características basales de los niños, la media de edad gestacional era de 40 semanas y sólo 2 niños presentaban una edad gestacional menor de 37 semanas. El peso medio al nacimiento era de 3 kg y el porcentaje de niños ligeramente mayor que el de niñas. La duración media de la lactancia era de 40 semanas (Tabla 7).

	Mediana (RIQ) o n (%) N=201
<b>Características maternas</b>	
Edad, años	
18-22	50 (24.9%)
23-26	54 (26.9%)
27-30	63 (31.3%)
31-40	34 (16.9%)
Nivel de educación completado	
Ninguno	11 (5.5%)
Primaria	125 (62.2%)
Secundaria o terciaria	65 (32.3%)
Paridad	3 (2-5)
Regimen PMTCT	
Durante el embarazo	166 (82.6%)
Durante el parto	200 (99.5%)
Estadio clínico del VIH según la OMS	
Estadio I	182 (90.5%)
Estadios II, III	19 (9.5%)
Recuento CD4 (células/ $\mu$ L)*	525 (436-624)
% ARN del VIH-1 detectable (>300 copias/mL)*	68 (33.8%)[200]
<b>Características infantiles</b>	
Edad gestacional, semanas	40 (39-40) [200]
Peso al nacer, kilogramos	3 (2.8-3.3)
Sexo masculino	102 (50.7%)
Duración lactancia, semanas	40.4 (36.3-43)

**Tabla 7. Características basales socio-demográficas, clínicas e inmunoviroológicas de las 201 parejas madres-niños**

\* Semana 1 postparto

Los datos son números (n) y porcentajes (%) de sujetos o la media (rango intercuartílico: RIQ) de valores. Para las variables con valores perdidos, el número de participantes se especifica entre corchetes.

Abreviaturas: PMTCT, en inglés Prevention of mother-to-child transmission

### C. Prevalencia de la infección por el VEB al año de vida

La infección por el VEB, en base a la presencia de anticuerpos IgG anti-VCA, fue diagnosticada en el 43% (87/201) de niños HEU a la semana 50 de vida. Todas las madres presentaron una serología positiva al VEB a la semana 1 postparto.

La edad de adquisición del VEB fue considerada como aquella en la que el ADN del VEB era detectado por primera vez en las muestras DBS secuencialmente analizadas (semana 1, 6, 14, 26, 38 y 50). Se analizaron una media de 6 muestras DBS por niño (RIQ 4-6).

El ADN del VEB fue detectado al menos una vez en 59 de los 87 niños (68%) del estudio, mientras que nunca fue detectado en los 28 niños restantes (32%). El porcentaje de infección aumentaba con el tiempo: 5% a la semana 6, 7% a la semana 14, 14% a la semana 26, 32% a la semana 38 y 42% a la semana 50 (Figura 13). El número de muestras DBS analizadas no fue mayor entre los niños que presentaron al menos una muestra positiva en ADN del VEB con respecto a los niños con ninguna muestra positiva. Todas las muestras DBS resultaron negativas en ADN del VEB a la semana 1 postparto.

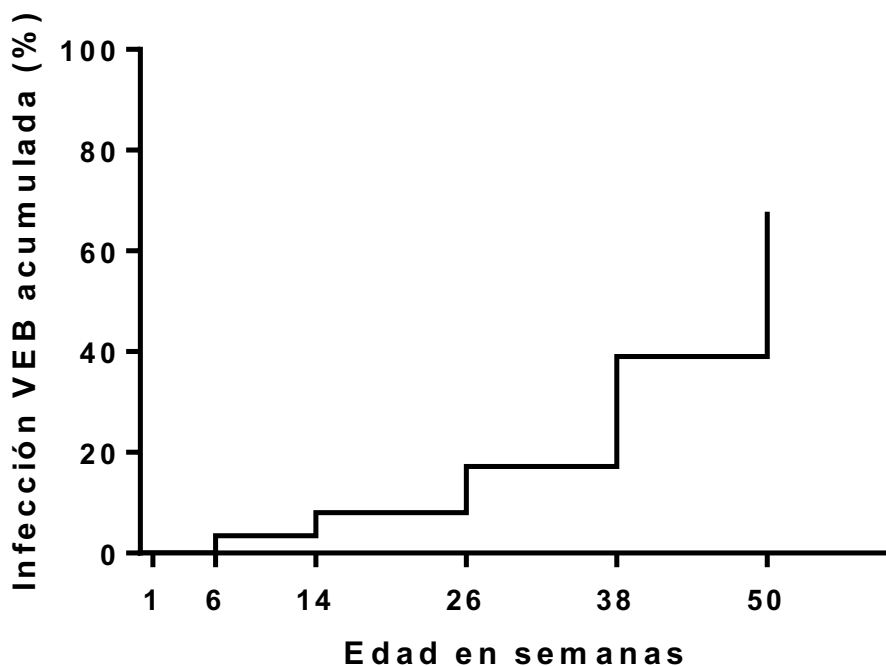


Figura 13. Incidencia acumulada de la infección por el VEB según una curva Kaplan-Meier

La figura representa la incidencia acumulada de la infección por el VEB en los niños con una serología positiva al VEB a la semana 50 (N=87). La edad de la primoinfección se calcula únicamente en los niños con al menos una determinación positiva en ADN del VEB en alguna de las muestras DBS analizadas durante el seguimiento (N=59). Ninguna infección fue detectada en la semana 1.



**D. Presencia de ADN del VEB en muestras de leche y plasma maternos**

La presencia de ADN del VEB en muestras de leche materna a la semana 1 postparto fue detectada en el 19% (35/188) de las madres de nuestra cohorte, mientras que sólo un 8% de las madres (15/197) mostraron niveles de ADN del VEB positivos en plasma. La presencia de muestras positivas en leche era más frecuente entre las madres con muestras positivas también en plasma (20% [7/35] vs. 5.3%[8/152];  $P = .007$ ) (Figura 14).

Entre las muestras positivas en ADN del VEB, los niveles del VEB fueron mayores en las muestras de leche (rango 75 a 34.200 copies/mL) que en las muestras de plasma (de 2 a 342 copies/mL) y los niveles entre ambos compartimentos se correlacionaban de forma discreta, pero significativa ( $R = 0.228$ ;  $P = .002$ ) (Figura 15).

Las madres con muestras de leche positivas en ADN del VEB presentaban más frecuentemente una viremia del VIH positiva en plasma (niveles detectables de ARN del VIH) que las madres con muestras de leche negativas (48.6% [17/35] vs 30.3% [46/152];  $P = .042$ ) (Figura16).

Los niveles de ADN del VEB en leche materna no se correlacionaban con los niveles de ARN del VIH en plasma.

Las madres con niveles detectables del VEB en leche presentaban un recuento menor de linfocitos CD4 que las madres con niveles indetectables del VEB en leche (mediana: 451 células/ $\mu\text{L}$ , RIQ: [391–550] vs. 549 cells/ $\mu\text{L}$  [451–638];  $P = .005$ ) (Figura 17).

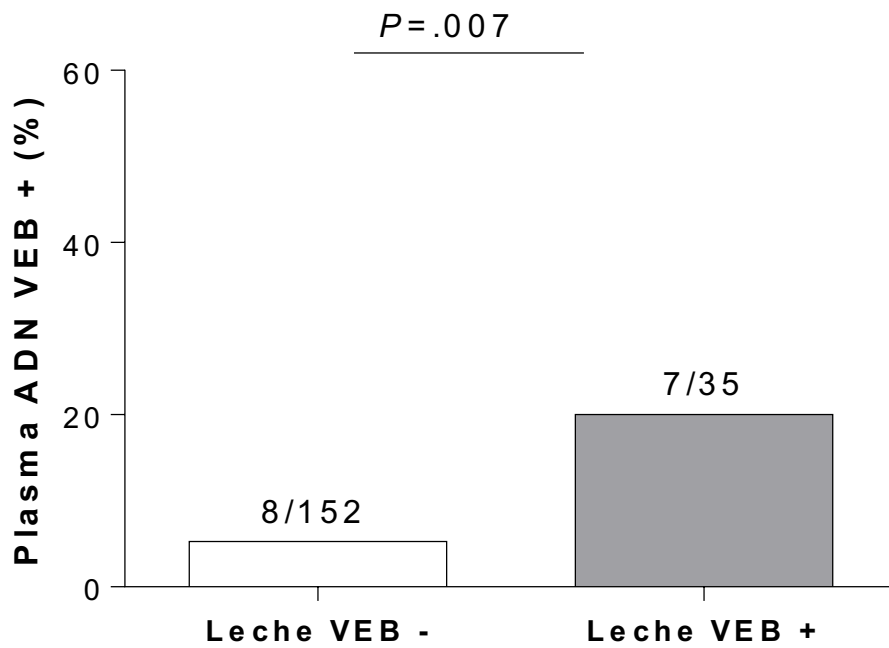


Figura 14. Representación en barras del porcentaje de madres con muestras positivas en ADN del VEB en plasma según la presencia (Leche + VEB) o no (Leche - VEB) de ADN del VEB en la leche

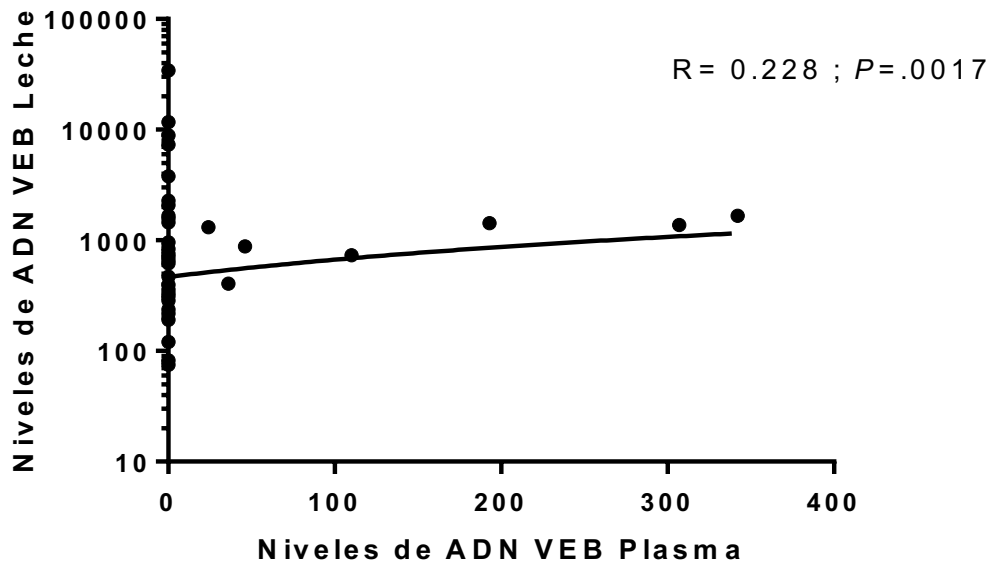


Figura 15. Correlación entre los niveles de ADN del VEB en leche y plasma maternos

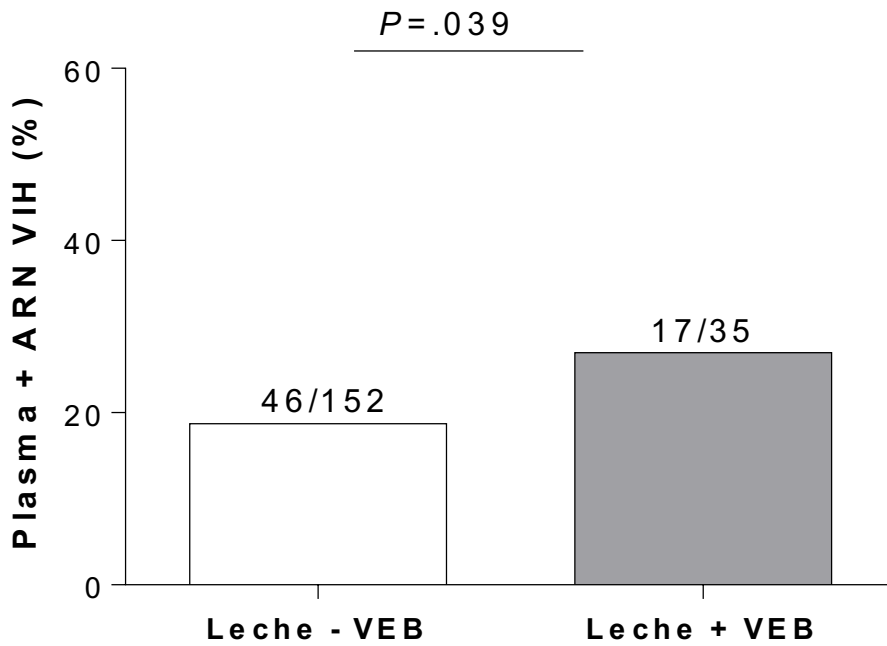


Figura 16. Representación en barras del porcentaje de madres con niveles detectables de ARN del VIH en plasma según la presencia (Leche + VEB) o no (Leche – VEB) de ADN del VEB en la leche

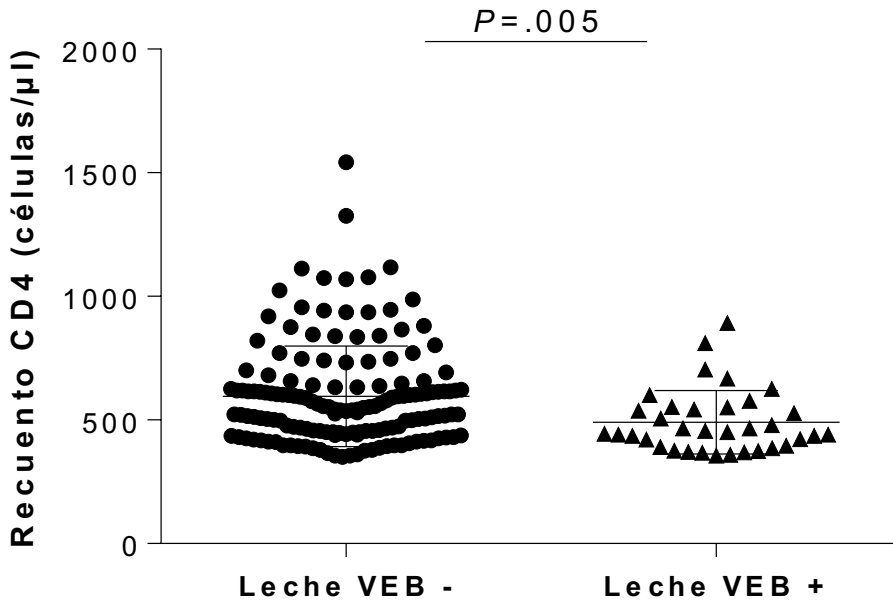


Figura 17. Recuento materno de linfocitos CD4 según la presencia o no de ADN del VEB en muestras de leche

Las líneas intermedias y las barras terminales representan la media y la desviación standard del recuento de linfocitos CD4 entre las madres con o sin niveles detectables del VEB en muestras de leche. Las diferencias entre las medias de linfocitos CD4 de cada grupo fueron comparadas con el test Wilconsin-Mann–Whitney.

## RESULTADOS

---

En el análisis multivariado, tras ajustar por la edad, el estadio clínico OMS y la presencia o no de una viremia detectable del VIH, únicamente la presencia del VEB en plasma y el recuento bajo de CD4 en la madre permanecían asociados a la presencia del VEB en leche materna (Tabla 8).

Infección por VEB en niños HEU

	N (%) o Mediana (RIQ)		Estimación cruda <sup>a</sup>			Estimación ajustada <sup>b</sup>		
	Leche + ADN EBV (N = 35)	Leche – ADN EBV (N = 152)	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
Edad (años)	25 (20-29)	26 (23-30)	0.96	0.89-1.04	.308			
Paridad	3 (1-4.25)	3 (2-5)	0.94	0.78-1.14	.524			
Estadio clínico VIH según OMS (II/III vs.I)	5(14.3%)	12 (5.8%)	1.73	0.50-6.30	.378			
Recuento CD4 (células/ $\mu$ L)*	451 (391-550)	549 (451-638)	1.00	0.99-1.00	<b>.005</b>	1.00	0.99-1.00	<b>.018</b>
ARN VIH plasma* (detectable vs.no)	17 (48.6%)	46 (30.3%)	2.18	1.03-4.59	<b>.042</b>	2.03	0.91-4.53	.082
ADN VEB plasma* (detectable vs.no)	7 (20%)	8 (5.3%)	4.5	13.41	<b>.007</b>	4.23	1.32-13.57	<b>.015</b>

**Tabla 8. Análisis univariado y multivariado de los factores asociados a la presencia de ADN del VEB en leche materna a la semana 1 postparto**

\* semana 1 postparto

<sup>a</sup> Estimación cruda en el análisis univariado

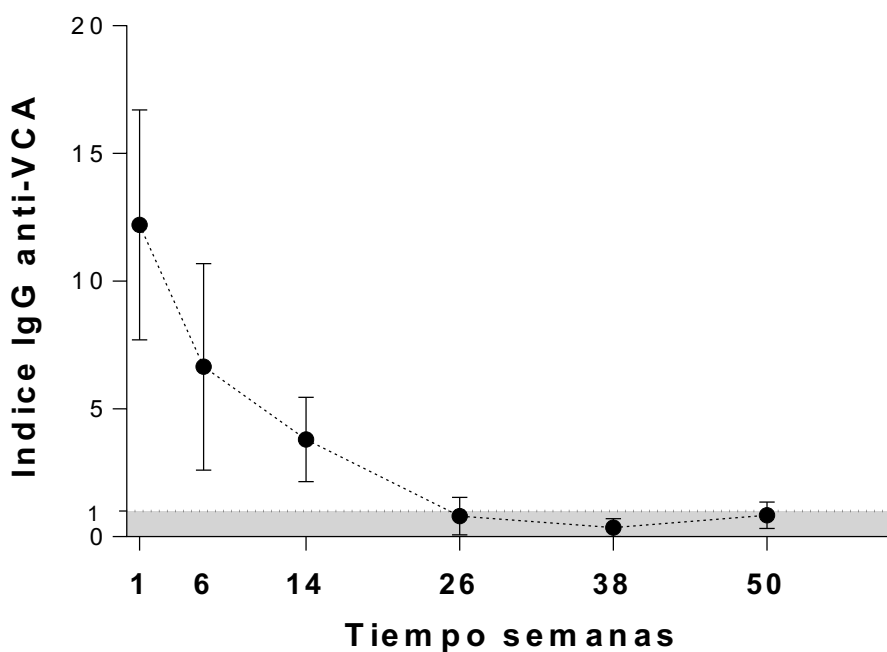
<sup>b</sup> Odds ratio ajustada usando un modelo de regresión logística con una selección backward (las variables con un valor  $P < .20$  en el análisis univariado son incluidas en el modelo multivariado).

Abreviaturas: OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza

**E. Traslación de anticuerpos IgG anti-VCA vía trasplacentaria**

Todos los niños analizados en este estudio (N=150) presentaron un índice de anticuerpos IgG anti-VCA superior al umbral de positividad a la semana 1 de vida (mediana: 8.18, RIQ: 5.70-12.89).

En un subgrupo de 10 niños con serología negativa al VEB a la semana 50 de vida se cuantificó de forma secuencial los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a lo largo del primer año de vida. La figura 18 representa una estimación de la caída de los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a lo largo del seguimiento.



**Figura 18. Estimación de la caída de anticuerpos maternos a lo largo del primer año de vida**  
 La media de los valores está indicada por los círculos negros y las barras representan la desviación estándar. La zona gris indica los valores situados por debajo del umbral de positividad.

**F. Exposición al paludismo**

El ADN de *P. falciparum* o *P. vivax* fue detectado en un 6.8% (12/177) de los niños en la semana 26 y en 10.9% (21/197) de los niños a la semana 50. La mayoría de parasitemias asintomáticas eran secundarias a la especie *P. falciparum*. Sólo uno de los niños analizados a la semana 26 y dos niños a la semana 50 presentó una muestra positiva en ADN del *P. vivax*.

**G. Eventos adversos graves**

Entre los 201 niños incluidos en este estudio, 107 presentaron un EAG (grado 3 o 4) durante el seguimiento: 48 niños infectados por el VEB y 59 no infectados. Doce y 20 niños respectivamente presentaron dos o más EAG y sólo tres niños presentaron tres o más EAG a lo largo del seguimiento. La frecuencia y tipo de EAG que fue registrado en la base de datos central del estudio ANRS 12174 se muestran en la Tabla 9. Los EAG biológicos fueron más frecuentes (~ 40%) que los clínicos (~11%), sin diferencias significativas entre los dos grupos de niños (infectados o no infectados por el VEB a la semana 50). La anemia y la neutropenia fueron los EAG más frecuentemente declarados en ambos grupos, con una frecuencia aproximada del 30% y 15% respectivamente. Entre los EAG clínicos, la infección por malaria fue el diagnóstico clínico evocado más frecuente, en casi la mitad de los casos.

**RESULTADOS**

	N (%)		P
	VEB + (N=87)	VEB - (N=114)	
Infección por el VEB a la semana 50			
Al menos un EAG	48 (55.17%)	59 (51.75%)	.630
EAG ≥ 2	12 (13.79%)	20 (17.54%)	.317
<b>EAG biológicos (al menos 1)</b>	38 (43.68%)	46 (40.35%)	.636
Anemia	32 (36.78%)	38 (33.33%)	
Neutropenia	17 (19.54%)	22 (19.30%)	
Trombocitopenia	2	3	
Otros *	1	2	
<b>EAG clínico (al menos 1)</b>	10 (11.40%)	13 (11.49%)	.984
Malaria	5 (5.74%)	10 (8.77%)	
Neumonía**	2	4	
Septicemia	1	0	
Sarampión	1	0	
Diarrea y gastroenteritis de probable origen infeccioso	0	3	
Otros***	4	2	

**Tabla 9. Eventos adversos graves entre los niños infectados y no infectados por el VEB**

Los datos son números (n) y porcentajes (%) de sujetos. Sólo se muestran los porcentajes > 5%. Valor P indica la comparación entre ambos grupos

\* Hipercolesterolemia, hiperglicemia y hiperpotasemia

\*\* Neumonía: diagnóstico basado en síntomas clínicos y radiología compatible

\*\*\* Malnutrición grave, deshidratación, quemaduras que afectan menos del 10% de la superficie corporal.

La suma del número total de EAG clínicos registrados en cada grupo (niños infectados o no por el VEB) no coincide con el número de niños con al menos un EAG clínico (primera línea) puesto que algunos niños presentaban más de un EAG clínico a lo largo del seguimiento.

Abreviaturas: EAG, eventos adversos grave



**H. Análisis univariado y multivariado de los factores maternos e infantiles asociados a la infección por el VEB en el primer año de vida**

Con el fin de identificar los factores de riesgo asociados a la infección por el VEB en los niños, evaluamos la relación entre las diferentes variables, maternas e infantiles, y la adquisición del VEB durante el primer año de vida, a través de un análisis univariado y multivariado.

Entre las variables maternas, encontramos que la infección por el VEB era más frecuente entre los niños nacidos de madres jóvenes, tanto si explorábamos esta variable como continua (mediana: 25 años, RIC: [21–29] vs. 27 [23–30];  $P = .038$ , datos no mostrados) o categórica ( $P = .029$ ) (Tabla 10). La infección por el VEB también era más frecuente entre los niños nacidos de madres con niveles de ARN del VIH detectables en plasma (42.5% [36/87] vs. 27.4% [31/114];  $P = .026$ ) (Tabla 10). Sin embargo, la infección por el VEB no era más frecuente entre los niños de madres con recuentos menores de linfocitos CD4 ni estadios clínicos más avanzados de la clasificación OMS (más inmunodeprimidas) (Tabla 10). No encontramos ninguna asociación significativa entre infección por el VEB y el nivel de educación materno, la paridad ni la duración de la lactancia (Tabla 10).

Cuando analizamos la relación con la presencia del VEB en leche y plasma maternos, objetivamos que la infección por el VEB durante el primer año de vida era más frecuente entre los niños nacidos de madres con niveles detectables del VEB en leche (27.5% [22/80] vs 12% [13/108];  $P = .009$ ), y tendía igualmente a ser más frecuente entre los niños cuyas madres presentaban niveles detectables del VEB en plasma (11.9% [10/84] vs 4.4% [5/113];  $P = .059$ ) (Tabla 10).

RESULTADOS

	Mediana (RIQ) o n (%)		Estimación cruda <sup>a</sup>			Estimación ajustada <sup>b</sup>		
	Niños VEB+(N=87)	Niños VEB-(N=114)	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
<b>Factores maternos</b>								
Edad (años)								
18-22	29 (33.3%)	21 (18.4%)	0.73	0.56-0.97	.029	0.69	0.51-0.93	.014
23-26	22 (28.1%)	32 (25.3%)						
27-30	24 (34.2%)	39 (29.6%)						
31-40	12 (13.8%)	22 (19.3%)						
Nivel de educación (1 <sup>ª</sup> vs. ≥ 2 <sup>ª</sup> )	57 (65.5%)	68 (59.6%)	0.75	0.41-1.36	.341			
Paridad	3 (2-5)	3 (2-5)	0.97	0.84-1.12	.668			
Estadio clínico VIH según OMS (I vs. II/III)	76 (87.4%)	106 (93%)	1.92	0.74-4.99	.182			
Recuento CD4 (células/μL)*	521 (438-627)	529 (430-627)	1.00	0.99-1.00	.535			
ARN VIH detectable plasma*	37 (42.5%)	31 (27.4%) [113]	1.96	1.08-3.54	.026			
ADN VEB detectable plasma*	10 (11.9%)[84]	5 (4.4%) [113]	2.92	0.96-8.89	.059			
ADN VEB detectable leche*	22 (27.5%)[80]	13 (12%) [108]	2.77	1.30-5.92	.009	2.66	1.23-5.77	.013
<b>Factores infantiles</b>								
Edad gestacional, semanas	40 (39-41)	40 (39-41)	1.00	0.79-1.26	.985			
Índice IgG anti-VCA*	7.31 (5.79-11.68) [61]	9.09 (5.43 – 18.60) [89]	0.99	0.98-1.02	.880			
ADN <i>P. falciparum/vivax</i> S26/50 s (≥1 vs. 0)	16 (14.1%)	16 (18.4%)	1.38	0.65-2.94	.404			
EAG durante primer año de vida (≥1 vs. no)	48 (55.17%)	59 (51.75%)	1.15	0.65-2.01	.630			
Tipo de profilaxis ARV (lopinavir-ritonavir vs. lamivudina)	50 (57.5%)	58 (50.9%)	1.30	0.74-2.29	.353			

**Tabla 10. Análisis univariado y multivariado de los factores asociados a la infección por el VEB en los niños HEU a la semana 50 de vida**

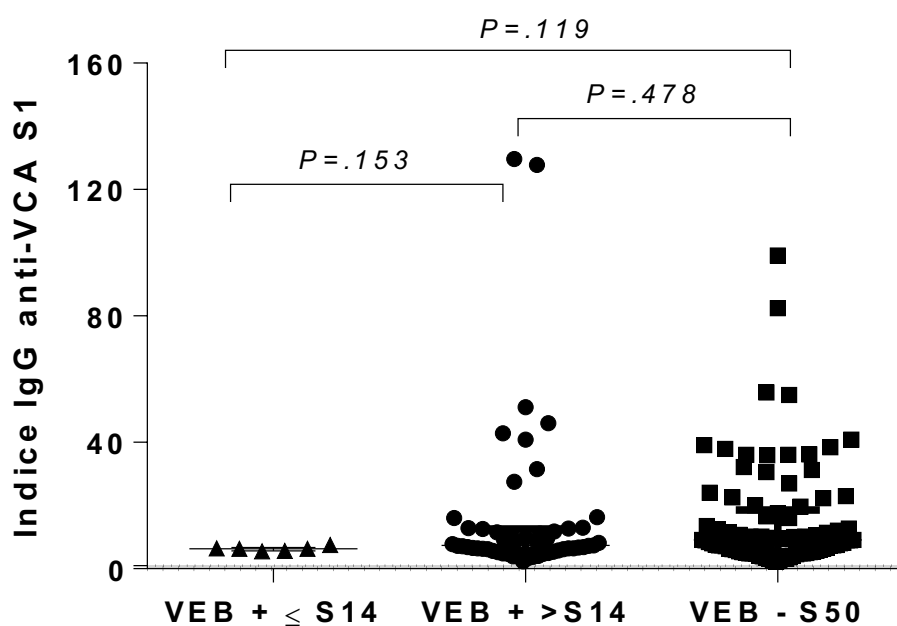
\* semana 1 postparto

<sup>a</sup> Estimación cruda en el análisis univariado

<sup>b</sup> Odds ratio ajustada usando un modelo de regresión logística con una selección (las variables con un valor P menor de .20 en el análisis univariado son incluidas en el modelo multivariado).

Abreviaturas: OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; EAG, eventos adversos graves

En el análisis univariado no encontramos ninguna asociación entre las diversas variables clasificadas como infantiles y la infección por el VEB en los niños. El índice de anticuerpos IgG anti-VCA a la semana 1 de vida no era significativamente diferente entre los niños infectados o no por el VEB a la semana 50 de vida (mediana 7.31 [RIC: 5.79-11.68] vs. 9.09 [RIC: 5.43 – 18.60];  $P = .880$ ) (Tabla 10). Sin embargo, los niños infectados antes o a la semana 14 tendían a presentar, aunque lejos de la significación, un índice de anticuerpos IgG anti-VCA menor que los niños infectados mas allá de la semana 14 (mediana 6.31 [RIC: 5.64-6.79] vs. 7.43 [RIC: 5.85 – 12.65];  $P = .153$ ), o que los niños no infectados (9,08 [RIC: 5.43-18.61];  $P = .119$ ) (Figura 19).



**Figura 19. Diferencias en lo niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a la semana 1 postparto entre los niños infectados precozmente (antes o a la semana 14), después de la semana 14 o no infectados por el VEB a la semana 50**

Las líneas intermedias y las barras terminales representan la media y la desviación standard del índice de anticuerpos IgG anti-VCA en cada grupo. Las diferencias en los niveles medios fueron comparadas con el test Wilconsin-Mann–Whitney. La pequeña zona gris indica el umbral de positividad (1).

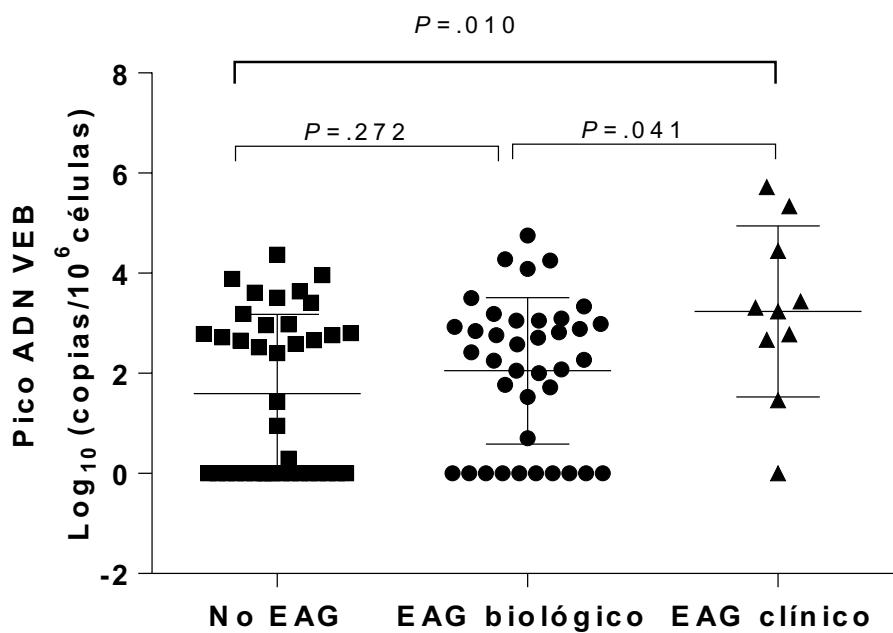
En cuanto a la exposición al paludismo, la infección por el VEB a la semana 50 no fue más frecuente entre los niños que habían presentado una parasitemia por *P. falciparum* y/o *P. vivax* asintomática durante el seguimiento (bien a la semana 26 o 50) ( $P = .404$ ) (Tabla 10). Ninguna de las dos estrategias profilácticas utilizadas con el fin de evitar la transmisión vertical del VIH (lopinavir-ritonavir o lamivudina), mostró un efecto protector contra la adquisición del VEB durante el primer año de vida ( $P = .353$ ) (Tabla 10). Por último, los niños infectados por el VEB a lo largo del primer año de vida, no sufrieron más EAG, ya fueran clínicos y/o biológicos durante el seguimiento ( $P = .630$ ) (Tabla 10).

Cuando evaluamos mediante un análisis multivariado los factores asociados a la infección por el VEB a la semana 50, únicamente la presencia del VEB en leche materna y la edad joven de las madres permanecieron independientemente asociados a la infección por el VEB en los niños (Tabla 10).

I. Factores asociados con una carga viral elevada del VEB en los niños

Entre los niños con niveles detectables del ADN del VEB en muestras DBS, la mayoría presentaron un único valor positivo (72%, 43/59) a lo largo del seguimiento, mientras que sólo 11 niños presentaron dos muestras positivas y cinco niños, tres muestras. La mediana y el RIQ del pico de viremia del VEB fue de 713 copias/10<sup>6</sup> células (261–2739 copias/10<sup>6</sup> células).

El pico de viremia del VEB fue mayor entre los niños que presentaron un EAG clínico (N=10) (mediana 3.27 log<sub>10</sub>, RIQ: 2.37-4.67) frente a los que no presentaron ningún EAG (N=39) (mediana 1.43 log<sub>10</sub>, RIQ, 0-2.96) (*P* = .010) o presentaron un EAG de carácter biológico (N=38) (mediana 2.34 log<sub>10</sub>, RIQ, 0-3.05) (*P* = .041) (Figura 20).



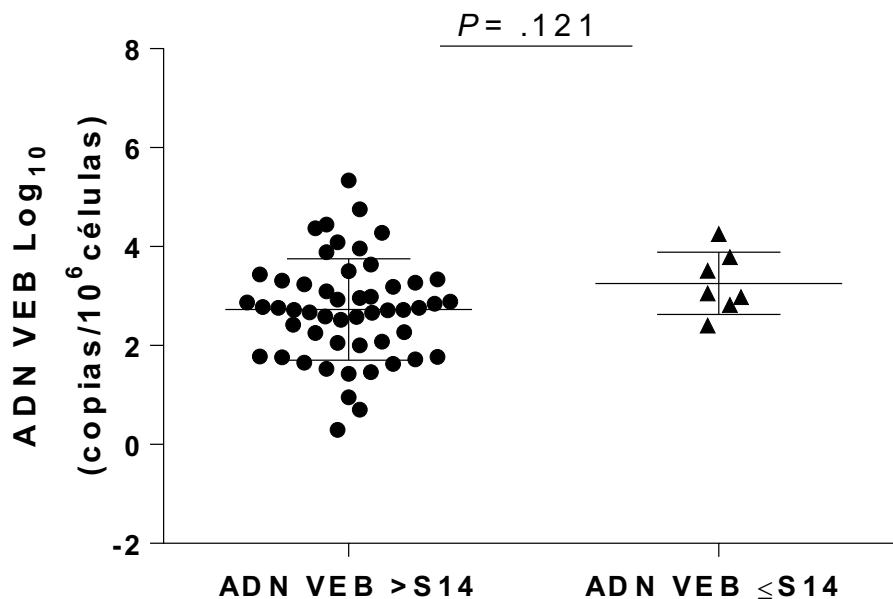
**Figura 20. Niveles de ADN del VEB según la ocurrencia de eventos adversos graves (EAG)**

El pico de ADN del VEB (el nivel más elevado cuantificado durante el estudio) fue comparado entre los niños que no tuvieron ningún EAG ni biológico (alteración de un parámetro de laboratorio, p.ej. anemia) ni clínico (N=39) o que tuvieron un EAG biológico (N=38) o un EAG clínico (p.ej. neumonía) (N=10). Las líneas intermedias y las barras terminales representan la media y la desviación standard del pico de viremia del VEB en cada grupo. Las diferencias en los niveles medios fueron comparadas con el test Wilcoxon-Mann-Whitney.

El pico de viremia del VEB fue detectado en la mayoría de ocasiones en la visita posterior a aquella en la que se registró el EAG (tiempo medio de 10 semanas). Sólo en dos casos, el pico fue detectado cuatro semanas antes de la fecha de la declaración del EAG. Los picos de viremia más elevados ( $> 5 \log_{10}$  copias/ $10^6$  células) fueron hallados en dos niños que habían presentado respectivamente tres EAG (malnutrición grave, deshidratación y malaria) y un EAG clínico (malnutrición grave). En el primer caso, la primera muestra positiva en DBS fue detectada a la sexta semana de vida (edad de adquisición de la infección) y un repunte de carga viral (pico) fue detectado cinco semanas antes de que el EAG fuera declarado. Este niño mostraba niveles persistentemente elevados en las visitas comprendidas entre el inicio y el fin de los EAG (13 semanas). En el segundo caso, la viremia del VEB fue detectada una sola vez durante una visita posicionada después de la fecha de inicio y antes del fin del EAG. En tres niños en los cuales el EAG declarado fue exclusivamente malaria, el pico de viremia fue detectado en la visita inmediatamente posterior al diagnóstico (una semana después en todos los casos). En los tres niños restantes, con diagnósticos de neumonía, septicemia y quemaduras de menos del 10% de la superficie corporal, la media de tiempo entre la fecha en la que se producía el pico virémico y en la que se declaraba el EAG era de 25 semanas. Sólo en un caso, en el que el EAG declarado fue malaria, el ADN del VEB nunca llegó a detectarse.

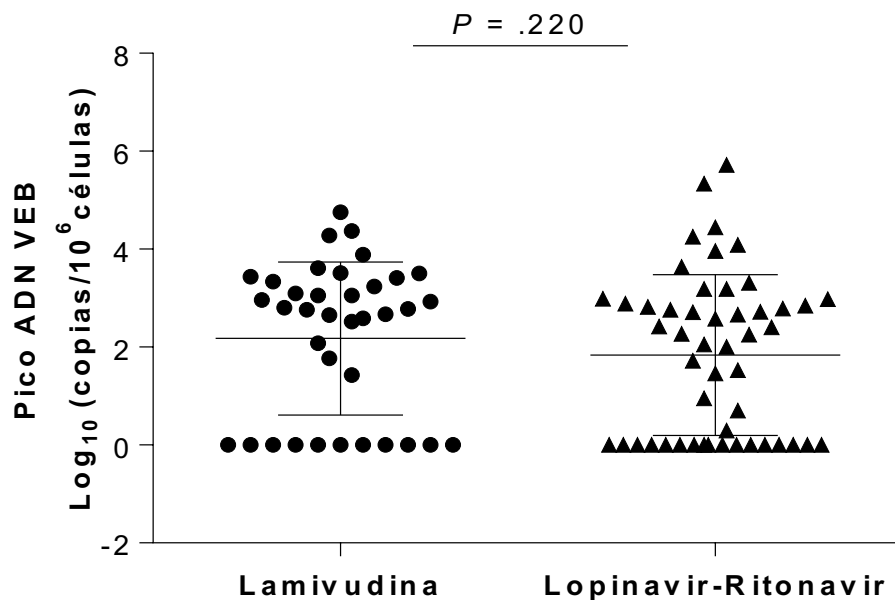
Cuando comparamos los niveles de ADN del VEB según la edad de adquisición (primera determinación positiva), no existían diferencias significativas entre los niños infectados precozmente (antes o en la semana 14) (N=7) y los niños que adquirían la infección posteriormente (semana 26 o después) (N=52) (mediana  $3.19 \log_{10}$  [RIQ: 2.82-4.24] vs.  $2.79$  [RIQ: 2.31-3.39];  $P = .121$ ) (Figure 21).

El pico de viremia no fue significativamente mayor entre los niños que presentaban una muestra positiva de ADN de *P. falciparum* o *P. vivax* a la semana 26 o 50 de vida ( $P = .346$ ) ni tampoco entre los niños que recibieron lopinavir-ritonavir vs. lamivudina como profilaxis ARV ( $P = .220$ ) (Figura 22).



**Figura 21. Niveles de ADN del VEB según la edad de adquisición del VEB**

Los niveles de ADN del VEB fueron comparados entre los niños que adquirieron la infección después de la semana 14 (N=52) o antes o en la semana (N=7). Las líneas intermedias y las barras terminales representan la media y la desviación standard del pico de viremia del VEB en cada grupo. Las diferencias en los niveles medios fueron comparadas con el test Wilconsin-Mann-Whitney.



**Figura 22. Niveles de ADN del VEB según la profilaxis antiretroviral recibida**

Las líneas intermedias y las barras terminales representan la media y la desviación standard del pico de viremia del VEB en cada grupo. Las diferencias en los niveles medios fueron comparadas con el test Wilconsin-Mann-Whitney.



**J. Infección por el VEB y crecimiento al año de vida**

Para estudiar la posible influencia de la infección por el VEB en el crecimiento, analizamos la asociación entre los diferentes parámetros antropométricos y el hecho de haber adquirido la infección por el VEB a lo largo del seguimiento. En el análisis univariado, encontramos que los niños que habían adquirido la infección por el VEB durante el primer año de vida presentaban más frecuentemente un *Z score* del P/L de moderada a severamente anormal ( $< -2$  DS) en comparación con los niños que no han adquirido la infección al año de vida (66.7% [10/15] vs 33.3% [5/15];  $P = .024$ ) (Tabla 11). Además de la infección por el VEB a la semana 50, la edad gestacional baja y la ocurrencia de al menos 1 EAG (ya fuera clínico o biológico) durante el seguimiento también se asociaron a la presencia de un *Z score* anormalmente bajo ( $< -2$  DS). No encontramos una asociación significativa entre la profilaxis ARV recibida por los niños y la alteración en el parámetro P/L.

En el análisis multivariado, la infección por el VEB, la edad gestacional baja y la ocurrencia de al menos un EAG permanecían significativamente asociadas a un *Z score* del P/L inferior a  $-2$  DS independientemente de la edad y del estado inmunovirológico de la madre (recuento de CD4 y viremia del VIH) (Tabla 11).

RESULTADOS

	P/L		Estimación cruda <sup>a</sup>			Estimación ajustada <sup>b</sup>		
	Z score > -2 DS (N=15)	Z score < -2 DS (N=143)	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
Edad (años)	27 (20-34)	26 (19-33)	1.00	0.91-1.11	0.959			
Recuento CD4 (células/ $\mu$ L)*	523 (330-716)	538 (359-717)	1.00	0.99-1.00	0.453			
ARN VIH-1 detectable plasma *	7 (46.7%)	47 (33.1%)	0.56	0.19-1.65	0.293			
Peso al nacer, kilogramos	2.9 (2.8-3.2)	3 (2.8-3.3)	0.99	0.99-1.00	.361			
Edad gestacional, semanas	39 (38-40)	40 (39-40)	0.57	0.38-0.86	<b>.008</b>	0.54	0.33-0.89	<b>.007</b>
Duración lactancia, semanas	39.86 (33.14-44.86)	40.57 (36.43-43)	1.02	0.95-1.11	.554			
Profilaxis antiretroviral (lopinavir-ritonavir vs. lamivudina)	8 (53.3%)	68 (47.6%)	1.26	0.43-3.66	<b>.670</b>			
Infección por el VEB semana 50 (si vs. no)	10 (66.7%)	50 (35%)	3.72	1.20-11.48	<b>.022</b>	5.27	1.47-18.94	<b>.011</b>
Al menos un EAG <sup>c</sup> durante el seguimiento (si vs. no)	13 (86.7%)	76 (53.1%)	5.73	1.25-26.32	<b>.025</b>	5.11	1.06-24.75	<b>.043</b>

**Tabla 11. Factores asociados con una alteración en el P/L a la semana 50 (análisis univariado y multivariado)**

\*semana 1

<sup>a</sup> Estimación cruda en el análisis univariado

<sup>b</sup> Odds ratio ajustada usando un modelo de regresión logística con una selección backward (las variables con un valor *P* menor de .20 en el análisis univariado son incluidas en el modelo multivariado)

<sup>c</sup>EAG: todos los eventos adversos graves grado III or IV (ya sean biológicos o clínicos)

Abreviaturas: P/L, peso para la longitud; DS, desviación standard; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; EAG, eventos adversos graves

Cuando analizamos el resto de parámetros antropométricos disponibles al año de vida, no encontramos ninguna asociación entre la infección por el VEB y un *Z score*  $< -2$  DS del P/E y L/E a la semana 50.

Sin embargo, los niños que adquirían la infección en el primer semestre de vida (antes o a la semana 26) presentaban un *Z score* de los parámetros P/E y L/E más frecuentemente anormal que los niños no infectados. En el análisis univariado, un *Z score* del P/E  $< -2$  DS era más frecuente entre los niños infectados precozmente que entre los niños no infectados a lo largo del seguimiento (33.3% [3/9] vs. 8% [112/149]; OR: 5.76, IC 95%: 1.26-25.74;  $P = .026$ ). Igualmente, el *Z score* de L/E era más frecuentemente anormal ( $< -2$ DS) entre los niños infectados por el VEB a la semana 26 en comparación con los niños no infectados a lo largo del seguimiento (44.4% [4/9] vs. 14,1% [21/149]; OR 4.87, IC 95%: 1.21-19.64;  $P = .023$ ).

## VII. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis exploramos los factores maternos e infantiles que se asocian con la adquisición y control de la infección por VEB en un grupo de niños HEU y su posible impacto clínico. Los resultados obtenidos, en base a los objetivos e hipótesis de esta tesis, son contrastados con los datos procedentes de la literatura. Revisamos aquellos trabajos que, como en nuestro caso, se interesaron por el estudio de la infección precoz por el VEB en el contexto de la exposición al VIH o la malaria, bien en países occidentales o en África Subsahariana. La comparación de nuestros resultados con la literatura, nos permite describir los factores asociados a la infección temprana por el VEB así como sus posibles consecuencias a corto plazo en una población representativa de niños HEU ugandeses. En este estudio, identificamos que la exposición al VEB a través de la leche materna, determinada por el status inmunológico materno, se asocia de forma significativa con la adquisición de la infección por el VEB en los niños. Mostramos además, que el control de la infección por el VEB puede estar perturbado en los niños que sufren enfermedades intercurrentes durante el primer año de vida. Por último, observamos que la infección por el VEB, junto con el resto de comorbilidades, puede tener un efecto deletéreo en el crecimiento de este grupo de niños HEU durante la primera etapa de su vida.

## A. Factores asociados a la infección por el VEB

El objetivo principal del presente trabajo es el de identificar los factores asociados a la infección precoz por el VEB en un conjunto de niños HEU africanos. En primer lugar, analizamos el papel de la exposición al VEB a través de la madre, en base a la presencia del VEB en la leche y plasma maternos. En segundo lugar, estudiamos si los anticuerpos transferidos vía placentaria por la madre ejercen una protección contra la infección en los niños. En tercer y último lugar, tenemos en cuenta los factores socioeconómicos identificados en la literatura como factores de riesgo de la infección precoz por el VEB y estudiamos la relación entre infección por el VEB y las variables relacionadas disponibles en nuestro estudio.

### 1. *Shedding* del VEB en leche y plasma materna

Nuestra hipótesis de trabajo es que el control insuficiente de la infección por el VEB en la madre - presencia del VEB en leche y plasma maternos-, se asocia con un mayor riesgo de infección por el VEB en los niños. Para confirmar esta hipótesis, estudiamos los parámetros inmunoviroológicos maternos (recuento de linfocitos CD4 y viremia del VIH) que pueden relacionarse con la presencia del VEB en ambos compartimentos, mucoso y sanguíneo. Seguidamente, estudiamos la relación entre la presencia del VEB en plasma y en leche y la probabilidad de infección en los niños.

La mayoría de las madres que constituyen nuestra cohorte presentan un recuento de linfocitos CD4 superior a 500 células/ $\mu$ L y una carga viral del VIH inferior al nivel establecido como umbral de detectabilidad (300 copias/mL). Según las consideraciones de la época, este status inmunoviroológico era aceptable y el riesgo de transmisión vertical del VIH no justificaba la introducción de la triple terapia ARV. Sin embargo, en relación con el

VEB, sabemos que la ausencia de un tratamiento antiretroviral y en consecuencia la presencia de una infección VIH no controlada, puede favorecer el aumento de la replicación del VEB en sangre y en saliva (Petrara et al., 2012; Ouedraogo et al., 2014; Matrajt et al., 2017). En este trabajo, encontramos que cerca del 20% de las madres presentan una viremia detectable del VEB en la leche materna y que ésta se relaciona de forma significativa con el recuento de linfocitos CD4, la carga viral del VIH plasmática y también con la presencia del VEB en plasma. Este porcentaje de positividad del VEB en muestras de leche es menor que el objetivado en otros estudios, donde aproximadamente el 50% presentaban niveles detectables de ADN del VEB (Junker et al., 1991; Viljoen et al., 2015; Sanosyan et al., 2016). Esta diferencia es lógica de acuerdo con la cronología del muestreo, ya que las muestras tomadas en nuestro estudio son muy precoces (primera semana postparto) y se sabe que el *shedding* o excreción del VEB en leche aumenta progresivamente en las primeras semanas de lactancia (Junker et al., 1991). Nuestro grupo ha demostrado que el *shedding* del VEB en leche materna podría estar relacionado con el riesgo de transmisión del VIH (Viljoen et al., 2015) y que la presencia del VEB en este compartimento es más frecuente cuando la viremia VIH también es detectable y en el contexto de la mastitis subclínica (Sanosyan et al., 2016). En este estudio, no podemos aportar más información al respecto, puesto que no cuantificamos los niveles de ARN del VIH en leche materna ni el ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , indicativo de una mastitis subclínica cuando es mayor a 1. Cuando analizamos los niveles de ARN del VIH en plasma y los niveles del VEB en plasma o leche no encontramos ninguna correlación entre los mismos. Sin embargo, sí hallamos una correlación significativa (aunque modesta,  $\text{Rho} = 0.228$ ) entre los niveles del VEB en plasma y en leche, e igualmente una asociación significativa entre la presencia del VEB en plasma y en leche materna.

Con respecto a la presencia del VEB en plasma, el 8% de las madres incluidas en este estudio muestran niveles detectables del ADN del VEB en plasma. Este porcentaje resulta significativo, ya que el VEB es raramente detectable en plasma, incluso en PVV (Stevens et al., 2002; Amiel et al., 2009). El ADN del VEB se encuentra confinado en la fracción celular de la sangre, en el compartimento de células B, y su presencia en plasma es indicativa de una perturbación mayor en el control de la infección (Stevens et al., 2002; Ouedraogo et al., 2013). En estas madres, la presencia del VEB en plasma, aún en baja cuantía, refleja la capacidad del repertorio de células B de iniciar la replicación lítica en respuesta a los múltiples estímulos derivados de la infección VIH (p.ej. viremia del VIH, productos de translocación bacteriana) y al mismo tiempo la ineficacia de la respuesta celular T para yugular la infección. Cuando analizamos los factores asociados a la infección por el VEB en los niños, encontramos que los niños nacidos de madres con niveles detectables del ADN del VEB en plasma tienden a contaminarse más frecuentemente por el VEB que los niños de madres con muestras indetectables, aunque esta asociación no alcanza un nivel de significación estadística ( $P = .059$ ).

En la misma línea, pero esta vez, de forma claramente significativa ( $P = .009$ ) el riesgo de infección por el VEB está incrementado en los niños de madres con *shedding* del VEB en leche. La lactancia materna no se ha considerado hasta el momento un factor de riesgo de la transmisión vertical del VEB (Gantt et al., 2008). Sin embargo, un estudio reciente ha puesto en evidencia la posible capacidad infectiva de los virus presentes en la leche materna. La inoculación *in vitro* de muestras de leche positivas en ADN del VEB era capaz de producir una infección activa en los linfocitos de líneas celulares con la consiguiente transformación en blastos proliferativos (Daud et al., 2015). Nuestro grupo comprobó que un porcentaje considerable (40%) de muestras de leche positivas en ADN del VEB en

madres infectadas por VIH son resistentes a la acción de la enzima ADNasa, lo que implicaría la presencia de ADN encapsulado (Sanosyan et al., 2016). El ADN encapsulado, en contraposición al ADN libre liberado tras la lisis celular, traduce la presencia de partículas vírales con capacidad infectiva.

Aunque nuestros hallazgos están lejos de clarificar si la leche materna podría ser un vehículo de transmisión del VEB, si aportan una información valiosa sobre el comportamiento de este virus en un compartimento mucho menos conocido que la mucosa oral. Durante la lactancia, la glándula mamaria se convierte en tejido linfoide asociado a mucosas y las células B de la leche materna poseen un perfil diferente del compartimento sanguíneo, mas próximo al del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (MALT) con mayor proporción de células B de gran tamaño, plasmoblastos y células plasmáticas (Tuaille et al., 2009). La replicación del VEB depende del estado madurativo de la célula B, y en el caso de las mujeres infectadas por VIH, el paso de una infección latente a la fase lítica puede verse significativamente incrementado debido al estado de activación policlonal del linfocito B y la ausencia de una respuesta T eficaz que limite la infección. El *shedding* del VEB en leche refleja la interacción del virus en el tejido linfoide de la glándula mamaria con el sistema inmune debilitado de las madres, y en este sentido, podría considerarse como un marcador adicional de disfunción inmunitaria. El hecho de que exista una fuerte asociación entre la presencia del VEB en la leche materna y la infección por el VEB, después de ajustar por otras variables asociadas a la infección, confirma la hipótesis principal de nuestro trabajo. La presencia del VEB en leche materna constituye por tanto una medida adicional del grado de exposición viral a través de este compartimento mucoso, esencial en la primera etapa de vida, y del riesgo de infección en estos niños HEU.



## 2. Variables sociodemográficas

La infección precoz por el VEB se ha relacionado principalmente con factores socioeconómicos, como el bajo nivel de ingresos o de educación en la unidad familiar y condiciones de vida desfavorables que favorecerían el contacto entre convivientes (hacinamiento, familias numerosas, guarderías...) (Biggar et al., 1978a; Condon et al., 2014; Minhas et al., 2010). En este estudio, no encontramos una asociación significativa entre la infección por el VEB y las variables sociodemográficas disponibles en la base de datos central del estudio ANRS 12174. Ni el bajo nivel de educación materno ni la paridad (número total de hijos) se asociaron con un aumento del riesgo de la infección por el VEB en los niños.

Sin embargo, en este estudio, el riesgo de infección en los niños se asocia significativamente con la juventud de la madre, independientemente a otros factores de riesgo. En la literatura, únicamente un estudio realizado en Zambia a finales de los 90 encuentra una asociación similar entre la edad joven de la madre y la infección precoz por el VEB. Se trata sin embargo, de un riesgo mayor de infección congénita y en una población de niños no sólo expuestos sino también infectados por el VIH (HEI) (Gumbo et al., 2014). Las mujeres jóvenes podrían exponer a sus hijos a un riesgo mayor de transmisión del VEB al sufrir mas estrés en sus primeros embarazos, puesto que el estrés favorece la reactivación del VEB (Glaser et al., 1991). En este sentido, la reactivación del VEB es más frecuente en mujeres embarazadas que padecen depresión, probablemente debido a un mayor nivel de estrés (Christian et al., 2012; Haeri et al., 2011). Sin embargo, la asociación entre la reactivación del VEB durante el embarazo y otros parámetros que podrían estar ligados al estrés, como la edad materna, el origen racial, la paridad o la tenencia de un seguro médico no se ha podido demostrar (Haeri et al., 2010).

Por último, diversos estudios han mostrado que la seroconversión al VEB se produce precozmente en niños pertenecientes a determinadas “minorías” étnicas en países industrializados. Estos estudios muestran que los niños de origen afroamericano, hispano o asiático tienen un riesgo incrementado de infección temprana por el VEB en comparación a niños de origen caucásico (Condon et al., 2014). Los autores apuntan a que podrían existir determinantes genéticos y factores comportamentales característicos de cada grupo, que favorecerían la transmisión, el contacto temprano y la transmisión del VEB. En este sentido, Cedeberg et al (Clin Infect Dis 2019) encuentran que el *shedding* en saliva del VEB es más cuantioso en los padres de niños de origen afroamericano o hispano que en los de origen caucásico. Un trabajo holandés más reciente demuestra que gran parte de las diferencias de seroprevalencia entre grupos étnicos se atenúan al tomar en consideración otro tipo de variables relacionadas con el nivel socioeconómico, más desfavorables en estas comunidades (Jansen et al., 2016).

La población de niños HEU que forman parte de nuestra cohorte comparte el mismo origen étnico, y probablemente, la situación socioeconómica de sus hogares sea similar. En nuestro estudio, no podemos aportar más información con respecto al rol de estas variables sobre el riesgo de infección por el VEB en la población de niños HEU.

### 3. Protección de los anticuerpos IgG anti-VCA maternos

En este estudio, evaluamos el posible efecto protector de los anticuerpos transferidos por la madre contra la adquisición de la infección por el VEB en un subgrupo de 150 niños. Nuestros resultados a este respecto no nos permiten concluir que el nivel de anticuerpos maternos sea predictor de un menor riesgo de infección, puesto que no existen diferencias significativas en el nivel observado entre los niños infectados por el VEB o no a

la semana 50 de vida ( $P = .119$ ). Sin embargo, observamos que los niños infectados por el VEB durante el primer trimestre de vida suelen presentar niveles bajos de anticuerpos IgG anti-VCA (por debajo del percentil 35). En la pequeña muestra de 10 niños que no adquirieron la infección y en la que analizamos la evolución de los anticuerpos IgG anti-VCA a lo largo del primer año, podemos observar que la pérdida de anticuerpos es rápida y que probablemente se produzca entre los 3 y los 6 meses en la mayoría de niños.

La capacidad de los anticuerpos maternos de ejercer un rol protector contra la infección es una cuestión relevante. De confirmarse, una vacuna capaz de generar un nivel suficiente de anticuerpos protectores podría proporcionar inmunidad contra la infección. Aunque son pocos los trabajos que han evaluado la relación entre el nivel de anticuerpos transferidos desde la madre y el riesgo de adquisición precoz del VEB, se asume que la infección por el VEB raramente ocurre antes de la desaparición de los anticuerpos maternos (Biggar et al., 1978b; Piriou et al., 2012; Reynaldi et al., 2016). Según el estudio de Biggar RJ et al (Int J Cancer 1978), la desaparición de los anticuerpos IgG anti-VCA ocurre entre el 2 y el 8° mes de vida y la infección tiene lugar aproximadamente 2 meses después de alcanzar niveles indetectables. En dicho estudio, el porcentaje de infecciones antes de la desaparición de anticuerpos era muy bajo y sólo un 5% de los niños se había infectado por el VEB en el primer semestre de vida (Biggar et al., 1978b). Aunque los anticuerpos IgG anti-VCA no son anticuerpos neutralizantes, los autores sugieren que sus niveles probablemente reflejen la dinámica de los anticuerpos protectores transferidos vía placentaria. Los anticuerpos IgG anti-EBNA y los anticuerpos neutralizantes, que también fueron medidos en este trabajo, eran detectados en menos de 2/3 de los niños al mes de vida y alcanzaban niveles indetectables al 4° mes (Biggar et al., 1978b).

La transferencia defectuosa de anticuerpos maternos ha sido propuesta como uno de los mecanismos responsables de la infección precoz entre los niños expuestos a la malaria o al VIH en África Subsahariana (Gantt et al., 2016; Ogolla et al., 2015; Slyker et al., 2014). El equipo de Rochford R. et al objetivó que la transferencia trasplacenteria de anticuerpos IgG anti-VCA y EBNA estaba disminuida en niños nacido de madres con malaria, corroborando esta hipótesis (Ogolla et al., 2015). El mismo grupo había demostrado que el hecho de vivir en un área hiperendémica de malaria en Kenia aumentaba el riesgo de adquisición precoz del VEB y que la frecuencia de la infección antes de los 6 meses de vida era de más del doble en niños residentes en una región de alta endemia (35%) con respecto a los niños que residían en un área de baja endemia (frente a un 12%) (Piriou et al., 2012). Estos porcentajes son llamativamente superiores al 5% descrito por Biggar et al a finales de los años 70. Pero más allá del hecho de vivir en un área hiperendémica o no de paludismo, el trabajo de Piriou E. et al (J Infect Dis 2012) muestra que la edad de adquisición de la infección se correlacionaba con la edad en la que se producía la pérdida de anticuerpos maternos. Solo en 9 casos, de un total de 150, la infección ocurría antes de la pérdida de los anticuerpos maternos, que fue estimada hacia el cuarto mes de vida. A través de una modelización, ponen igualmente de manifiesto que el nivel de anticuerpos disminuye más rápidamente en los niños expuestos e infectados por la malaria y que la caída de anticuerpos constituye el mayor predictor de infección por el VEB, independientemente del nivel de exposición al paludismo (Reynaldi et al., 2016).

La infección precoz por el VEB también ha sido descrita en niños HEI del África Subsahariana. El porcentaje de infección por el VEB alcanzó el 14% a los 3 meses de vida en un estudio keniano (Slyker et al., 2014) mientras que fue similar (13%) en otro grupo de niños HEI de Zambia evaluados todavía más precozmente (sexta semana de vida) (Gumbo

et al., 2005). Como podemos comprobar en nuestra cohorte, la proporción de niños HEU infectados por el VEB en el primer trimestre de vida es muy similar: 12% (7/15) en el primer trimestre (14 semana de vida), alcanzando el 25% en el primer semestre de vida (26 semana de vida). En el marco de la infección VIH, la perturbación en la transferencia de anticuerpos madre-hijo frente a patógenos más comunes como el tétanos, neumococo o el sarampión ha sido descrita (Isabel de Moraes-Pinto et al., 1996). Hasta el momento, este aspecto no había sido abordado en el contexto de la infección por el VEB y el VIH.

Aunque nuestros resultados no son concluyentes desde el punto de vista estadístico, van a favor de un probable efecto protector de los anticuerpos maternos frente a la infección por el VEB. Los niños infectados precozmente tienden a presentar niveles bajos de anticuerpos anti-VCA y la frecuencia de la infección aumenta progresivamente con el tiempo, en paralelo a la pérdida de los anticuerpos. Los anticuerpos anti-VCA, aun sin ser neutralizantes *per se*, probablemente sean indicativos del nivel de defensa provisto por la madre a través del traspaso de otros anticuerpos protectores.

#### **B. Prevalencia de la infección al año de vida**

En este estudio, aproximadamente la mitad de los niños HEU (43%) adquiere la infección por el VEB durante el primer año de vida, un 25% en el primer semestre de vida y un 75% en el segundo. Estos porcentajes son similares a los encontrados en otros estudios realizados a finales de los años 90 fundamentalmente en países del África del Este. La incidencia de la infección por el VEB al año de vida fue del 40 % en una cohorte de niños HEU en Kenia (Slyker et al., 2013), mientras que fue ligeramente mayor, del 50%, en un estudio realizado en Zambia (Minhas et al., 2010). De forma similar, la incidencia fue del

47% en una pequeña muestra de niños HEU ugandeses a finales de los años 2000 (Gantt et al., 2016) (Tabla 11).

La infección durante la infancia es frecuente en África Subsahariana, e incluso antes de la irrupción de la epidemia VIH, los estudios disponibles mostraban que la seroconversión al VEB se producía de forma precoz, durante los dos primeros años de vida. A finales de los años 70, en un área urbana en Ghana, un estudio mostró que la seroconversión al VEB se producía en cerca del 50% de los niños al año de vida (Biggar et al., 1978b) mientras que un estudio realizado en una zona rural de Uganda (endémica en LB) confirma que aproximadamente el 100% de los niños estudiados han seroconvertido a los dos años (de-The et al., 1975). En un estudio más reciente realizado en Gambia, la tasa de seroconversión en niños no expuestos al VIH es similar, y el 62% de los niños estudiados presentan una serología compatible con una infección pasada entre los 14 y 18 meses de vida (Jayasooriya et al., 2015). Estos datos nos permiten apreciar que la edad de seroconversión al VEB en el África Subsahariana no difiere de forma significativa entre los niños africanos expuestos y no expuestos al VIH (Tabla 12).

Sin embargo, entre los niños no sólo expuestos, sino también infectados por el VIH, la prevalencia al año de vida todavía es mayor, y según un estudio keniano, la mayoría de los niños HEI (80%) han seroconvertido al VEB al año de vida (Slyker et al., 2013). De forma similar, la fuerte exposición a la malaria, también favorece la infección precoz por el VEB, y la prevalencia de la infección por el VEB al año de vida es casi del 100% en áreas hiperendémicas de malaria (Piriou et al., 2012) (Tabla 12).

En comparación, no sólo la infección por VIH en el niño sino también la mera exposición al VIH materno, poseen un impacto mayor sobre la epidemiología del VEB en países occidentales. Como sabemos, la infección por el VEB es menos frecuente durante la

infancia en occidente, donde la adquisición precoz se ha relacionado con factores socioeconómicos y étnico/raciales. En dos estudios realizados en Estados Unidos y Canadá a finales de los años 90, el porcentaje de seroconversión entre los niños expuestos, infectados o no por el VIH, era considerable comparado con los niños no expuestos. Entre los niños HEU variaba entre el 31% al año de vida (Jenson et al., 1999) y el 55% a los 30 meses (Pedneault et al., 1998), mientras que entre los niños HEI era del 23% en el primer estudio y del 73% a los 2 años de vida en el segundo (Pedneault et al., 1998). La mayoría de los niños incluidos en estos estudios eran de origen afroamericano (en el primero) o haitiano/africano (en el segundo) (Tabla 12).

A modo de resumen, podemos decir que el impacto de la exposición y/o la infección por VIH en la edad de seroconversión al VEB resulta mucho más significativo en países occidentales, donde el riesgo de infección precoz por el VEB es bajo en niños sanos. Como también muestran nuestros resultados, la exposición al VIH no parece ser tan relevante en países africanos, donde la infección temprana es la norma. Sin embargo, tanto la infección infantil por VIH así como la fuerte exposición a paludismo, son condiciones que favorecen la adquisición aún más precoz del VEB en África Subsahariana.

**DISCUSIÓN**

<b>Estado de la población</b>	<b>Año del estudio</b>	<b>Lugar</b>	<b>Tamaño muestra</b>	<b>Prevalencia VEB 1 año (%)</b>	<b>Prevalencia VEB 2 años (%)</b>	<b>Autor</b>
<b>Expuestos VIH</b>	1987-1993	Canadá	HEI (15) HEU (47)		73% (30*) 55% (30*)	Pedneault, 1998
	1998	EEUU	HEI (80) HEU (384)	23.2% 31.7%		Jenson, 1999
	1998-2004	Zambia	HEI (41) HEU (636)	80% 57%		Minhas, 2010
	1999-2003	Kenia	HEI (75) HEU (50)	73% 40%	96%	Slyker, 2013
	2008-2009	Uganda	HEU (15)	47%		Gantt, 2016
	2009-2011	Uganda	HEU (201)	43%		Montoya-Ferrer, 2020 (este trabajo)
<b>Expuestos a malaria</b>	1988-97	Kenia	Alta (68) Baja (82)	97% 88.9%	100% 100%	Piriou, 2012
	1978	Ghana	(31)	44%	81%	Biggar, 1978
<b>No expuestos</b>	2015	Gambia	(114)	61% (14-18*)	-	Jayasooriya, 2015
	2013	EEUU	Afroamericanos (30) Caucásicos(55)	-	53% (5 años) 17% (5 años)	Condon, 2014k
	>2008	Reino Unido	Pakistaníes (472) Caucásicos (391)	-	50% 25%	Pembrey, 2019

**Tabla 12. Prevalencia de la infección por el VEB según área geográfica, exposición a la infección VIH o malaria u origen étnico**

Los valores muestran el número de sujetos (n) y/o el porcentaje (%)

\* meses

Abreviaturas: HEU: HIV exposed uninfected children; HEI: HIV exposed infected children; EEUU: Estados Unidos



### C. **Determinantes del control de la infección por el VEB en los niños**

Uno de los objetivos secundarios de este trabajo, es el de estudiar los posibles factores asociados al control de la infección por el VEB en los niños.

Para ello, analizamos la relación entre los niveles del VEB en las muestras DBS y las diversas variables que podrían causar una perturbación en el sistema inmune del niño, y por tanto, contribuir a un aumento de la replicación y del *turn-over* del virus en sangre. Nuestros resultados muestran que la presencia de eventos adversos graves (EAG) clasificados como clínicos, se asocia de forma significativa con picos de viremia más elevados del VEB en sangre. No encontramos ninguna relación, sin embargo, con la presencia de una parasitemia asintomática de *P. falciparum* o *P. vivax* (exposición al paludismo), la precocidad de la infección por el VEB o la profilaxis ARV recibida por los niños.

#### 1. **Enfermedades intercurrentes**

En esta cohorte, los niños que han sufrido EAG, clasificados como clínicos (p.ej. neumonía o malaria) presentan los picos de viremia del VEB más elevados. En la mitad de casos (5 de 10 niños), estos picos virémicos se producen poco antes o después del debut del EAG clínico (Tabla 9). En 4 de los 5 niños en los que el EAG es una malaria aguda (diagnóstico clínico y microbiológico compatible), el pico de viremia del VEB se produce inmediatamente después del diagnóstico del EAG (aproximadamente 1 semana después).

La asociación entre fenómenos clínicos y picos virémicos del VEB ya ha sido descrita en los niños HEU y HEI por Slyker J. et al (J Infect Dis 2013). Los autores demuestran por un lado que la infección por VIH es responsable de una perturbación importante en el reservorio del VEB. Los niños HEI presentan viremias del VEB más elevadas y durante más

tiempo que los niños HEU, que muestran niveles detectables raramente. La mayoría de los niños HEU de nuestro estudio se comportan de forma similar, y menos del 20% (16/87) muestran 2 o más muestras positivas en ADN del VEB frente al 80% con una o ninguna muestra positiva (43/87 y 28/87 respectivamente).

Por otro lado, Slyker J. et al (J Infect Dis 2013) describen que durante las visitas clínicas en las que se detectan los picos virémicos del VEB, los niños (especialmente los HEI) presentaban con mayor frecuencia síntomas y signos clínicos (tos, fiebre, hepatoesplenomegalia) o infecciones intercurrentes (neumonía). Ante estos hallazgos, los autores sugieren que la infección por el VEB podría ser causa de una morbilidad importante en los niños expuestos al VIH, particularmente en los HEI.

Durante cualquier proceso infeccioso o incluso en situaciones de estrés, se producen defectos transitorios en la respuesta inmune (Klenerman and Hill, 2005; Honke et al., 2016) que pueden favorecer la reactivación del VEB y el aumento de sus niveles en sangre (Ternak, 2003; Kerr, 2019;). Esto sucede claramente en el contexto de la infección VIH o el paludismo, como ya hemos visto (Moormann et al., 2005; 2007; Petrara et al., 2012; Piriou et al., 2012; Slyker et al., 2013). Igualmente, la infección por el VEB, también puede generar una perturbación en el sistema inmune (p.ej. expansión de los linfocitos citotóxicos, inhibición de la producción de anticuerpos) que podría aumentar la susceptibilidad a padecer otras infecciones (Junker et al., 1986; Scherrenburg et al., 2008).

De hecho, las coinfecciones con varios agentes infecciosos no son inhabituales en población pediátrica y durante la infección aguda por el VEB, se han diagnosticado infecciones concomitantes con otros virus (p.ej. infecciones por virus respiratorio sincitial, sarampión) o bacterias (neumonía por *Chlamydia* o *Mycoplasma pneumoniae*) (García-

Peris et al., 2019; Sumaya and Ench, 1985). En una cohorte de niños diagnosticados por el VEB de forma ambulatoria, los test serológicos demostraban la presencia de una infección viral sobreañadida en 1 de cada 5 casos (p.ej. herpes simplex 6 y citomegalovirus) (García-Peris et al., 2019; Sumaya and Ench, 1985). El porcentaje de coinfección era todavía mayor (60%) en una serie de niños hospitalizados por una mononucleosis infecciosa (Wang et al., 2010).

En nuestra cohorte, encontramos una asociación entre los picos virémicos y la presencia de EAG clínicos, pero la elevación de los niveles del VEB no se produce necesariamente al mismo tiempo que el EAG. A diferencia de Slyker J. et al. (J Infect Dis) no creemos que exista una relación causal directa entre la infección por el VEB y la aparición de fenómenos adversos. Nuestra interpretación es que la concurrencia de diferentes eventos adversos, ya sean infecciosos o no, probablemente sea lo suficientemente importante para debilitar la respuesta inmune contra el VEB, y desencadenar aumentos de la carga viral del mismo. De forma bidireccional, la infección por el VEB probablemente pueda aumentar la susceptibilidad de esta población, ya de por sí vulnerable (Evans et al., 2016; Ruck et al., 2016; Ruperez et al., 2017), a padecer otras enfermedades intercurrentes.

## 2. Paludismo y precocidad de la infección por el VEB

En nuestro trabajo, encontramos una asociación entre malaria y picos virémicos, pero únicamente cuando consideramos la malaria como uno más de los eventos adversos clínicos declarados a lo largo del seguimiento. Como vimos en la introducción, la malaria produce una profunda alteración en la respuesta inmunológica al VEB, que conducen a un aumento de la replicación viral. Los niños con una infección aguda de malaria pueden llegar a presentar niveles extremadamente elevados del VEB, comparables a los de una

mononucleosis infecciosa (Moormann et al., 2005) y los niveles de viremia pueden correlacionarse con el número y gravedad de los episodios palúdicos (Donati et al., 2006; Lam et al., 1991). Aunque no todos los estudios reflejan esta tendencia (Yone et al., 2006), el tratamiento antipalúdico puede tener un efecto beneficioso en la reducción de la viremia del VEB (Donati et al., 2006).

En nuestro estudio, no conseguimos detectar ninguna relación entre picos virémicos y paludismo cuando estudiamos esta variable en base a la presencia de una parasitemia asintomática (ADN de *P. falciparum* y/o *P. vivax* en muestras DBS). En esta cohorte, menos del 11% de los niños, hayan o no adquirido la infección por el VEB durante el primer año de vida, presentan una parasitemia asintomática por *P. falciparum* o *P. vivax* en las dos visitas analizadas (semana 26 y 50). Probablemente este porcentaje es demasiado bajo para encontrar una asociación entre los picos virémicos y el grado de exposición al paludismo, como la descrita por Piriou E. et al (J Infect Dis 2012).

En dicho trabajo, los autores demuestran también que existe una relación entre la precocidad de la infección y los niveles elevados de viremia del VEB. Los niños que vivían en una región hiperendémica de paludismo, se infectaban precozmente por el VEB y presentaban niveles mayores del VEB que los niños que vivían en una región de baja endemia. Además, los niveles de VEB en sangre variaban rápidamente en el tiempo, pero los niños que se infectaban precozmente, mantenían niveles persistentes de VEB en sangre, indicativos de un pobre control de la infección por el VEB (Piriou et al., 2012).

En nuestra cohorte, el número de infecciones precoces por el VEB es demasiado pequeño (n=7) y únicamente 6 de estos 7 niños presentan viremias detectables del VEB en las muestras DBS. Según nuestros análisis, los niveles de ADN del VEB no son

significativamente diferentes entre los niños infectados antes o después de la semana 14 ( $P = .121$ ).

### 3. **Profilaxis antiretroviral**

Por último, los niños que participaron en el ensayo ANRS 12174 recibieron una profilaxis ARV a base de lopinavir-ritonavir o lamivudina con el fin de evitar la transmisión vertical del VIH durante la lactancia.

La actividad antiviral de los inhibidores de la proteasa no se limita al virus del VIH y estos fármacos son capaces de inhibir la replicación de otros virus de la familia herpes (p.ej. HHV-8) (Soren Gantt, 2011) y como hemos comprobado recientemente, del coronavirus responsable de la COVID-19 (Yao et al., 2020). En relación con el VEB, un estudio llevado a cabo por Slyker J. et al (J Infect Dis 2014) describe las propiedades inhibitorias del lopinavir-ritonavir frente al VEB en un conjunto de niños HEI. En ese estudio, los niños HEI infectados vía vertical que recibían un tratamiento ARV a base de lopinavir-ritonavir controlaban la replicación del VEB más rápidamente que los niños que recibían nevirapina como tercer agente. Sin embargo, el lopinavir-ritonavir no ejerció un efecto preventivo frente a la adquisición del VEB, ni tampoco en el control del nivel de replicación del virus (Slyker et al., 2014).

En nuestro estudio, no encontramos ningún efecto aparentemente beneficioso sobre el control de la viremia o la prevención de la infección por el VEB en los niños que reciben una profilaxis ARV a base de lopinavir-ritonavir frente aquellos que reciben lamivudina.

### D. **Manifestaciones clínicas y crecimiento**

Para finalizar esta discusión, analizaremos en primer lugar, la asociación encontrada entre la infección por el VEB en los niños y la alteración de ciertos parámetros antropométricos al año de vida. En segundo y último lugar, discutiremos de manera general las posibles consecuencias clínicas de la adquisición precoz del VEB, no sólo a corto sino también a largo plazo,.

#### 1. **Crecimiento**

En este estudio observamos que los niños infectados por el VEB durante el primer año de vida, e incluso durante el primer semestre de vida, presentan diversas alteraciones en los parámetros antropométricos analizados: peso para la longitud (P/L), peso para la edad (P/E) y longitud para la edad (L/E). Existen pocos estudios que hayan evaluado la posible repercusión en el crecimiento en niños infectados por el VEB durante la primera etapa de la vida. Entre los niños no expuestos al VIH, un estudio norteamericano de los años 80, describe el caso de dos lactantes que presentaron síntomas de anorexia, pobre ganancia de peso y fatiga, poco antes del desarrollo de síntomas típicos de la primoinfección por el VEB (Sumaya and Ench, 1985). En el contexto del VIH, sólo el estudio de Gumbo H. et al (PLoS ONE, 2014) describe la presencia de un crecimiento anormal en niños HEI infectados precozmente por el VEB ( $\leq 6$  semanas), sin observar un aumento de mortalidad en dicha población.

En este estudio, la relación entre infección temprana (primer semestre) y alteración del P/E y L/E es difícil de interpretar, puesto que el número de niños infectados de forma precoz con alteraciones en los parámetros antropométricos es muy bajo, y no podemos

confirmar esta asociación a través de un análisis multivariado. En comparación, la relación entre infección por el VEB al año de vida y la alteración del P/L resulta más robusta. La infección por el VEB se asocia de forma significativa a la presencia de un P/L anormal al año de vida en el análisis multivariado, independientemente de la menor edad gestacional y la presencia de eventos adversos graves (EAG).

Como mencionamos en la introducción, la salud global de los niños expuestos y no infectados por VIH es una cuestión crucial en África Subsahariana, donde se calcula que más de 13 millones de niños HEU nacen al año (Slogrove et al., 2020). La mayoría de los estudios en los que se han reportado peores índices de salud (incremento de morbilidad, hospitalización o desnutrición) en los niños HEU en comparación con niños no expuestos al VIH han sido realizados antes de que la opción B+ estuviera disponible en África Subsahariana (le Roux et al., 2016). Según un metanálisis realizado en 2016, la mayoría de los estudios no tienen en cuenta, aparte de la exposición al VIH, otras variables importantes relacionadas con el desarrollo de los niños, como el estado de salud de la madre o el hecho de haber recibido lactancia natural (le Roux et al., 2016). Un estudio reciente llevado a cabo en Sudáfrica, en el que todos los niños HEU reciben lactancia materna y sus madres tratamiento ARV señala que existen alteraciones precoces pero ligeras en los diversos parámetros antropométricos en los niños HEU con respecto a sus homólogos no expuestos al VIH. Curiosamente, los autores señalan un incremento del riesgo de sobrepeso en ambos grupos al año de vida (le Roux et al., 2019).

En nuestro estudio, el estado de salud de las madres era lo suficientemente bueno para no recibir tratamiento ARV (según los cánones de la época) y todos los niños recibían lactancia natural. Aunque asumimos que la evaluación de un parámetro como el crecimiento es extremadamente compleja, nuestros resultados sugieren que la infección

por el VEB podría perturbar el crecimiento de algunos de estos niños HEU. En este sentido, el VEB podría ser considerado como uno de los múltiples agentes infecciosos, que al igual que el resto, podría contribuir a la morbilidad temprana en esta población de niños HEU.

Por último, un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo, objetiva una alteración de crecimiento al año de vida en el conjunto de niños participantes en el ensayo ANRS 12174 que recibieron una profilaxis ARV con lopinavir-ritonavir en comparación con los que recibieron lamivudina (Blanche et al., 2019). En esta cohorte de niños ugandeses, no encontramos ninguna asociación negativa entre el tipo de profilaxis ARV recibida y los parámetros antropométricos analizados.

### 2. **Consecuencias clínicas a corto y largo plazo**

En este último apartado, abordaremos la controversia entre manifestaciones clínicas e infección por el VEB, en base a nuestros resultados y a lo descrito en la literatura.

De forma breve, destacamos la posible implicación de la infección precoz por el VEB en el desarrollo del LBe así como la enorme importancia del VEB, debido a su capacidad oncogénica, en la población de niños que viven con VIH.

#### a) **Consecuencias clínicas a corto plazo**

En el ensayo clínico ANRS 12174, se recogían los EAG grados 3 o 4 que ocurrían a lo largo del seguimiento de los niños, coincidieran o no en el tiempo, con las visitas programadas en el ensayo. Aunque no disponemos de información más específica sobre algunos de los síntomas considerados como típicos de la infección por el VEB (p.ej. fiebre, amigdalitis, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, linfocitosis), el registro de todos los EAG, ya sean clínicos o biológicos, nos permite tener una visión bastante precisa del estado



de salud y de los diversos procesos intercurrentes que sobrevinieron a los niños durante su primer año de vida.

En esta cohorte de niños ugandeses, aquellos que se infectaron a lo largo del seguimiento por el VEB no presentaron más EAG que los niños no infectados por el VEB. La anemia fue el EAG más frecuentemente registrado (30% de los niños) seguido por la neutropenia (15%), y ambos fueron declarados en similar proporción en ambos grupos. La presencia de enfermedades intercurrentes (~10%), como malaria o neumonía, tampoco fue más frecuente en los niños infectados por el VEB a lo largo del estudio en comparación a los no infectados.

En general, se asume que la primoinfección por el VEB es asintomática cuando se produce durante la infancia. Sin embargo, la presencia de manifestaciones clínicas, como sugieren algunos estudios, probablemente sea más frecuente de lo pensado, incluso en niños sanos (Sumaya and Ench, 1985; Garcia-Peris et al., 2019). En las diversas cohortes de niños expuestos infectados o no por el VIH, se ha podido observar un aumento de la frecuencia de ciertas manifestaciones, como anemia (Gumbo et al., 2014), hepatoesplenomegalia (Pedneault et al., 1998; Slyker et al., 2013) o rash (Minhas et al., 2010) en los niños que se infectaban por el VEB, aunque otras series no encontraban ninguna asociación entre infección y fenómenos clínicos (Gantt et al., 2016). En el estudio de Slyker J. et al (J Infect Dis 2013), las manifestaciones fueron leves en el grupo de niños HEU (limitadas a la esfera mucosa- conjuntivitis y rinorrea-) pero más importantes en el grupo de niños HEI, en los que se describe un aumento de la frecuencia de neumonía y un mayor riesgo de hospitalización (Slyker et al., 2013).

En nuestra cohorte, no encontramos que los niños infectados por el VEB presenten síntomas sugestivos *per se* de una primoinfección ni que sufran más frecuentemente EAG

durante el seguimiento. Sin embargo, nuestros resultados probablemente indican que la infección por el VEB, aunque silente clínicamente, puede contribuir a la morbilidad de esta población de niños HEU. La relación entre los picos virémicos del VEB y la presencia de enfermedades intercurrentes, indicaría que los fenómenos patológicos que acontecen durante el primer año de vida, no se comportan de manera independiente, sino que al interactuar unos con otros, pueden tener un efecto sumatorio en la salud global del niño. La asociación entre la infección por el VEB y la alteración en ciertos parámetros de crecimiento, junto con otras variables, como la presencia de EAG y la menor edad gestacional, constituiría un argumento más a favor de esta hipótesis.

### **b) Consecuencias a largo plazo**

Desde que de-Thé et al. describieron por primera vez, la posible asociación entre infección temprana por el VEB, paludismo y LBe a finales de los años 70 (de-The, 1979; de-The et al., 1978) son numerosos los trabajos que han contribuido a reforzar esta hipótesis, demostrando las alteraciones que la malaria produce en el control de la infección por VEB en los niños africanos (Rainey et al., 2007; Piriou et al., 2012; Moormann and Bailey, 2016). En las regiones hiperendémicas de paludismo, se ha demostrado que los niños se infectan precozmente por el VEB y que a su vez, cuanto más precoz es la infección, los niños exhiben niveles mayores del VEB en sangre. Es lógico pensar que los estados que favorecen un aumento de la replicación del VEB, como la infección precoz o la fuerte exposición a la malaria, conllevan un aumento del riesgo de LBe durante la infancia. De hecho, los niños que desarrollan un LBe poseen no sólo un elevado nivel de anticuerpos contra el VEB sino también niveles elevados en sangre del VEB en comparación con sus homólogos sin linfoma (Moormann et al., 2005; Asito et al., 2010).

En el contexto del VIH, los hallazgos de Slyker J. et al (J Infect Dis 2013) van en la misma línea, mostrando que los niños HEI también se infectan precozmente y presentan viremias elevadas durante períodos prolongados. En comparación con las pocas semanas en las que la viremia es detectable durante la mononucleosis infecciosa (Bauer et al., 2005), la presencia de una replicación activa de forma persistente en los niños HEI (media de un año) podría favorecer la aparición de alteraciones citogenéticas en los linfocitos infectados, y por tanto, de células malignas.

El LB es uno de los linfomas más frecuentes en niños infectados por VIH, que suelen mostrar un estado de inmunodepresión moderado, con recuentos de CD4 por encima de 200 células/ $\mu$ l. En los países africanos con baja endemia de malaria, donde el LBe era poco prevalente antes de la aparición del VIH, se objetivó un incremento muy importante en la incidencia del tumor debido a su elevada frecuencia entre los niños infectados por VIH (Davidson et al., 2014). Sin embargo, en los países de África ecuatorial, donde el LB es endémico, no se ha podido objetivar un aumento similar y por el momento sólo pequeñas series han podido identificar una discreta asociación entre la infección VIH y el desarrollo del LBe (Newton et al., 2001) sin ser corroborada en otros estudios (Mutalima et al., 2010). Un estudio multicéntrico reciente llevado a cabo en 3 países considerados como endémicos de LBe (Kenia, Tanzania y Uganda) profundiza en este aspecto (Peprah et al., 2020). Sus resultados muestran que si bien la infección VIH se asocia a un mayor riesgo de LBe, su impacto es mucho más modesto que el de otras variables relacionados con la exposición al paludismo o con el estado socioeconómico (Peprah et al., 2020). Otros muchos factores todavía desconocidos -genéticos, inmunológicos, ambientales- deben estar implicados en el desarrollo del tumor. Entre ellos se han mencionado las infecciones por arbovirus, la

esquistosomiasis, e incluso la exposición a ciertas plantas, como *Euphorbiae tirucalli* o *Jatropha curcas*, comunes en las áreas donde el LB es endémico (Molyneux et al., 2012).

Pero además del LB, la trascendencia del VEB como oncovirus en el contexto del VIH pediátrico es importantísima ( Chiappini et al., 2007; Alvaro-Meca et al., 2011; Simard et al., 2012). En países occidentales, los tumores ligados al VEB representan más del 75% de tumores en los niños que viven con VIH, siendo los LNH los más comunes. El leiomioma es menos frecuente, pero el VEB está asociado en el 100% de casos en esta población (Singh et al., 2017). En África Subsahariana, el porcentaje de tumores ligados al VEB es algo menor (50%) debido a la mayor frecuencia del sarcoma de Kaposi asociado al HVV-8 (Rees et al., 2016; Singh et al., 2017). Afortunadamente, la transmisión perinatal del VIH, causa fundamental de la infección VIH en los niños, ha disminuido drásticamente para dar paso a la población de niños HEU. Aunque no existen estudios que hayan evaluado si existe un riesgo aumentado de linfomas asociados con el VEB en niños HEU, por el momento no se ha registrado un aumento de la incidencia de cánceres de todo tipo en esta población (Ivy et al., 2015).

## E. LIMITACIONES

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones tanto desde el punto de vista conceptual como metodológico.

En nuestro estudio, excluimos todas aquellas parejas de madres-niños que no habían completado las visitas establecidas en el ensayo clínico ANRS 12174 para tratar de evitar la heterogeneidad de datos entre las diferentes parejas. La inclusión de estas parejas, sin embargo, podría haber aumentado la fortaleza de algunos de nuestros resultados, al aumentar el tamaño muestral.

Desde el punto de vista metodológico también podemos señalar varias limitaciones. En primer lugar, para diagnosticar y datar la infección por el VEB empleamos dos métodos diagnósticos diferentes. Para diagnosticar la infección por el VEB a la semana 50 utilizamos la serología del VEB, en base a la detección de anticuerpos IgG anti-VCA. En cambio, para determinar la fecha de adquisición de la infección nos basamos únicamente en la detección del ADN del VEB en las muestras DBS y a diferencia de otros estudios (Piriou et al., 2012 ; Slyker et al., 2013), no realizamos simultáneamente un análisis serológico. El análisis exclusivo del ADN en muestras DBS para datar la infección subestima el número de infecciones en cada visita (curva Kaplan-Meier). Por otro lado, la presencia de viremias indetectables en las muestras DBS es frecuente y hace más complicado evaluar algunos de nuestros objetivos secundarios. Es el caso de la posible asociación entre la precocidad de la infección y niveles elevados del VEB o también, con el posible papel protector de los anticuerpos según la edad de adquisición. En ambos casos, hubiera sido necesario aumentar el tamaño muestral para poder obtener resultados concluyentes.

En tercer lugar, en este estudio, no podemos establecer una clara asociación entre malaria y alteración del control de la infección por el VEB. La región en la se realiza nuestro

estudio tiene un grado de endemidad medio-bajo de paludismo, y el grado de exposición en nuestra población, medido como parasitemia asintomática (ADN del *P. Falciparum* o *P. vivax*) es muy bajo (11%). La potencia de un test de comparación de proporciones entre 2 grupos (N= 200, prevalencia de malaria: 14.1- 18.4% y un riesgo de primera especie,  $\alpha = 5\%$ ), es insuficiente (17.6%) para detectar diferencias entre ambos grupos ( $Beta\ error = 82.4\%$ , siendo  $Beta$  la probabilidad de no poder demostrar diferencias entre los 2 grupos). Nuestros resultados son únicamente capaces de identificar una asociación entre la viremia del VEB y la malaria, en tanto y cuando ésta es considerada como un evento clínico adverso a lo largo del seguimiento.

Por último, aunque los resultados muestran que la infección por el VEB podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento, esta asociación merece una interpretación cautelosa. Esta variable es enormemente compleja, y esta influenciada por otras muchas variables que probablemente no hemos tenido en cuenta en nuestro estudio

### F. FORTALEZAS

Pese a todo lo comentado, consideramos que nuestro estudio también posee importantes fortalezas.

Gracias a la información obtenida del estudio principal, el ensayo ANRS 12174, podemos evaluar la relación entre la infección por el VEB y un número amplio y diverso de variables. Esto nos permite realizar un análisis mucho más completo de los factores de riesgo relacionados no sólo con la infección por el VEB sino también con el control de la misma en los niños y su posible repercusión clínica.

Más allá de las ventajas de haber podido contar con una valiosa información complementaria, la originalidad de nuestro estudio radica en el análisis del

comportamiento del VEB en la glándula mamaria y su relación con la situación inmunovirológica de las madres. Aunque no podamos concluir acerca del riesgo de transmisión del VEB a través de la lactancia, puesto que todos los niños eran amamantados en este estudio, nuestros resultados permiten demostrar que el *shedding* del VEB en leche materna puede ser considerado como una medida de exposición al virus, y por tanto, del riesgo de transmisión.

Por último, aunque las muestras utilizadas en nuestros análisis daten de la primera década del 2000, este estudio puede ser considerado como uno de los más recientes y representativos sobre la epidemiología del VEB en una población de importancia creciente en África Subsahariana, los niños expuestos pero no infectados por VIH.

#### **G. PERSPECTIVAS.**

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten plantear nuevas hipótesis, que esperamos poder llegar a verificar en los próximos años.

En primer lugar, consideramos que a partir del material disponible, podríamos profundizar en el estudio de la dinámica de los anticuerpos transferidos vía trasplacentaria. Nos gustaría inicialmente confirmar si existe una correlación entre los niveles plasmáticos de anticuerpos en la madre y en sus hijos. Igualmente, querríamos analizar el comportamiento de los anticuerpos anti-EA, especialmente en las madres, y verificar si la presencia de niveles aumentados, sugestivos de una reactivación, podrían aumentar el riesgo de infección en los niños. La cuantificación de los niveles de inmunoglobulinas IgG en la madre, nos permitiría estimar el impacto de la hipergammaglobulinemia en la transferencia de anticuerpos madre-hijo.

En segundo lugar, y también a partir de las muestras disponibles del ensayo ANRS 12174, podríamos investigar el comportamiento de otros virus de la familia herpesvirus, como el citomegalovirus (CMV), y su posible interacción con el VEB. En realidad, este objetivo se había planteado en el proyecto original de tesis, pero por falta de tiempo y medios no pudimos profundizar en este aspecto. Por un lado, querríamos comprobar si la infección por CMV puede ejercer un papel protector contra la adquisición de la infección por el VEB. Por otro lado, podríamos valorar el impacto clínico de la infección perinatal por CMV (mas allá de la congénita) en esta población.

En tercer lugar, una parte de los niños participantes en el estudio ANRS 12174 han realizado una evaluación clínica (incluido analítica de sangre) a los 6 años de edad. La evaluación del reservorio del VEB (viremia y niveles de anticuerpos) así como el devenir clínico de estos niños, nos podrían aportar una información valiosa sobre el comportamiento de este virus a largo plazo en los niños infectados precozmente.

Por último, en nuestro trabajo no disponíamos de muestras salivares para analizar la relación entre la excreción en saliva y el riesgo de transmisión del VEB. Aunque evidentemente fuera del marco del estudio ANRS 12174, sería interesante poder evaluar la relación entre los dos compartimentos mucosos (mucosa oral y glándula mamaria) a través del estudio de la excreción del VEB en leche materna y en saliva.



## VIII. CONCLUSIONES

1. La infección por el VEB en los niños HEU está asociada a la presencia del VEB en leche materna y es más frecuente entre los niños de madres jóvenes.
2. La presencia del VEB en leche materna está relacionada con el estado inmunológico de la madre, y es más frecuente entre las madres con bajos recuentos de linfocitos T CD4 y niveles detectables del ARN del VIH en plasma.
3. La presencia del VEB en leche materna se asocia a la presencia del VEB en plasma y los niveles de ADN del VEB se correlacionan en ambos compartimentos.
4. La adquisición de la infección por el VEB en los niños HEU es frecuente durante el primer año de vida, y la incidencia de la infección se incrementa progresivamente en el tiempo.
5. Los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA maternos (trasferidos vía trasplacentaria) no se asocian significativamente con el riesgo de infección por el VEB en los niños HEU.
6. El porcentaje de niños expuestos a la malaria (parasitemia asintomática del *P. falciparum* y/o *P. vivax*) es bajo en este estudio y no encontramos una asociación entre la infección por el VEB y la exposición a la malaria.
7. No existen diferencias significativas en el riesgo de infección por el VEB entre los niños que reciben una profilaxis ARV por lopinavir-ritonavir vs. lamivudina.
8. La ocurrencia de eventos adversos graves, ya sean clínicos o biológicos, no es más frecuente entre los niños infectados por el VEB al año de vida que entre los niños no infectados.

9. La presencia de enfermedades intercurrentes, como un episodio de neumonía o malaria, se asocia a la presencia de niveles elevados del VEB en sangre.
10. La infección precoz por el VEB no se asocia a la presencia de niveles elevados del VEB en sangre, sugestivos de un peor control de la infección cuanto menor es la edad de adquisición.
11. Los niños que reciben una profilaxis ARV con lopinavir-ritonavir no presentan niveles del VEB en sangre significativamente menores que los niños tratados con lamivudina.
12. La infección por el VEB en los niños HEU, independientemente de la menor edad gestacional o de la ocurrencia de eventos adversos graves (clínicos o biológico), se asocia a una alteración en el crecimiento de los niños HEU al año de vida.

## IX. CONCLUSIONS

1. EBV infection in HEU infants is associated with the presence of EBV in breast milk and is more frequent among children of young mothers.
2. The presence of EBV in breast milk is related to the mother's immune status, and is more common among mothers with low CD4 T lymphocyte counts and detectable levels of HIV RNA in plasma.
3. The shedding of EBV into breast milk is associated with the shedding of EBV into plasma and EBV DNA levels are correlated in both compartments.
4. Acquisition of EBV infection in HEU children is frequent during the first year of life, and the incidence of infection increases progressively over time.
5. Maternal anti-VCA IgG antibody levels (transplacentally transferred) are not significantly associated with the risk of EBV infection in HEU children.
6. The percentage of children exposed to malaria (asymptomatic parasitemia of *P. falciparum* and/or *P. vivax*) is low in this study and we do not find an association between EBV infection and exposure to malaria.
7. There are no significant differences in the risk of EBV infection between infants receiving ARV prophylaxis with lopinavir-ritonavir vs. lamivudine.
8. The occurrence of serious adverse events, whether clinical or biological, is not more frequent among EBV-infected infants at one year of life than among non-infected infants.
9. The presence of intercurrent diseases, such as an episode of pneumonia or malaria, is associated with the presence of high levels of EBV in the blood.
10. Early EBV infection is not associated with the presence of high levels of EBV in the blood.

11. Infants receiving ARV prophylaxis with lopinavir-ritonavir do not have significantly lower EBV blood levels than children receiving lamivudine.

12. EBV infection in HEU infants independently of the lower gestational age or the occurrence of serious adverse events (clinical or biological) is associated with an alteration in the growth of HEU infants at one year of life.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R. J., Pachnio, A., Pedroza-Pacheco, I., Leese, A. M., Begum, J., Long, H. M., et al. (2017). Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. *Journal of Virology* 91. doi:10.1128/JVI.00382-17.
- Adams, A., and Lindahl, T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 1477–1481. doi:10.1073/pnas.72.4.1477.
- Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R., and Carbone, A. (2010). The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J. Pathol.* 221, 248–263. doi:10.1002/path.2711.
- Alfieri, C., Tanner, J., Carpentier, L., Perpete, C., Savoie, A., Paradis, K., et al. (1996). Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87, 812–817.
- Alvaro-Meca, A., Micheloud, D., Jensen, J., Diaz, A., Garcia-Alvarez, M., and Resino, S. (2011). Epidemiologic trends of cancer diagnoses among HIV-infected children in Spain from 1997 to 2008. *Pediatr Infect Dis J* 30, 764–768. doi:10.1097/INF.0b013e31821ba148.
- Amiel, C., Legoff, J., Lescure, F. X., Coste-Burel, M., Deback, C., Fafi-Kremer, S., et al. (2009). Epstein-Barr virus load in whole blood correlates with HIV surrogate markers and lymphoma: a French national cross-sectional study. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 50, 427–429. doi:10.1097/QAI.0b013e31819a22ec.
- Arikawa, S., Rollins, N., Newell, M.-L., and Becquet, R. (2016). Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Trop Med Int Health* 21, 720–734. doi:10.1111/tmi.12695.
- Asito, A. S., Piriou, E., Odada, P. S., Fiore, N., Middeldorp, J. M., Long, C., et al. (2010). Elevated anti-Zta IgG levels and EBV viral load are associated with site of tumor presentation in endemic Burkitt's lymphoma patients: a case control study. *Infect. Agents Cancer* 5, 13. doi:10.1186/1750-9378-5-13.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (1999). Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.* 190, 567–576. doi:10.1084/jem.190.4.567.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497–506. doi:10.1016/s1074-7613(00)00049-2.

- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207–211. doi:10.1038/310207a0.
- Balfour, H. H. J., Odumade, O. A., Schmeling, D. O., Mullan, B. D., Ed, J. A., Knight, J. A., et al. (2013). Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students. *J Infect Dis* 207, 80–88. doi:10.1093/infdis/jis646.
- Balfour, H. H., Dunmire, S. K., and Hogquist, K. A. (2015). Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunology* 4, e33. doi:10.1038/cti.2015.1.
- Banwell, B., Krupp, L., Kennedy, J., Lancet, R. T. T., 2007 Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Psychiatry*.
- Banwell, B., Krupp, L., Kennedy, J., Tellier, R., Tenenbaum, S., Ness, J., et al. (2007). Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 6, 773–781. doi:10.1016/S1474-4422(07)70196-5.
- Barberà, J. A., Hayashi, S., Hegele, R. G., and Hogg, J. C. (1992). Detection of Epstein-Barr virus in lymphocytic interstitial pneumonia by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 145, 940–946. doi:10.1164/ajrccm/145.4\_Pt\_1.940.
- Bauer, C. C., Aberle, S. W., Popow-Kraupp, T., Kapitan, M., Hofmann, H., and Puchhammer-Stöckl, E. (2005). Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 75, 54–58. doi:10.1002/jmv.20237.
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J. P. A., and Tzoulaki, I. (2015). Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 14, 263–273. doi:10.1016/S1474-4422(14)70267-4.
- Bellan, C., Lazzi, S., De Falco, G., Nyongo, A., Giordano, A., and Leoncini, L. (2003). Burkitt's lymphoma: new insights into molecular pathogenesis. *J Clin Pathol* 56, 188–192. doi:10.1136/jcp.56.3.188.
- Bellows, D. S., Howell, M., Pearson, C., Hazlewood, S. A., and Hardwick, J. M. (2002). Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. *Journal of Virology* 76, 2469–2479. doi:10.1128/jvi.76.5.2469-2479.2002.
- Berntsson, M., Dubicanac, L., Tunback, P., Ellstrom, A., Lowhagen, G.-B., and Bergstrom, T. (2013). Frequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in cervical secretions from healthy young women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92, 706–710. doi:10.1111/aogs.12134.

- Bharti, A. R., Saravanan, S., Madhavan, V., Smith, D. M., Sharma, J., Balakrishnan, P., et al. (2012). Correlates of HIV and malaria co-infection in Southern India. *Malar J* 11, 306. doi:10.1186/1475-2875-11-306.
- Biggar, R. J., Chaturvedi, A. K., Goedert, J. J., Engels, E. A., HIV/AIDS Cancer Match Study (2007). AIDS-related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 962–972. doi:10.1093/jnci/djm010.
- Biggar, R. J., Henle, G., Böcker, J., Lennette, E. T., Fleisher, G., and Henle, W. (1978a). Primary epstein-barr virus infections in African infants. II. Clinical and serological observations during seroconversion. *Int J Cancer* 22, 244–250. doi:10.1002/ijc.2910220305.
- Biggar, R. J., Henle, W., Fleisher, G., Böcker, J., Lennette, E. T., and Henle, G. (1978b). Primary epstein-barr virus infections in african infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int J Cancer* 22, 239–243. doi:10.1002/ijc.2910220304.
- Blanche, S., Tylleskar, T., Peries, M., Kankasa, C., Engebretsen, I., Meda, N., et al. (2019). Growth in HIV-1-exposed but uninfected infants treated with lopinavir-ritonavir versus lamivudine: a secondary analysis of the ANRS 12174 trial. *Lancet HIV*. doi:10.1016/S2352-3018(18)30361-8.
- Borza, C. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* 8, 594–599. doi:10.1038/nm0602-594.
- Bouvard, V., Baan, R. A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, El, F., Benbrahim-Tallaa, L., et al. (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *The Lancet Oncology* 13, 339–340. doi:10.1016/s1470-2045(12)70125-0.
- Brady, G., MacArthur, G. J., and Farrell, P. J. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 60, 1397–1402. doi:10.1136/jcp.2007.047977.
- Brandt, C. D., Sison, A. V., Rakusan, T. A., Saxena, E. S., Kaufman, T. E., O'Donnell, R. M., et al. (1998). Epstein-Barr virus DNA in the blood of infants, young children, and adults by age and HIV status. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 17, 69–72.
- Browning, J. L. (2006). B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov* 5, 564–576. doi:10.1038/nrd2085.
- BURKITT, D. (1962). A tumour syndrome affecting children in tropical Africa. *Postgrad Med J* 38, 71–79. doi:10.1136/pgmj.38.436.71.
- Caccuri, F., Giagulli, C., Bugatti, A., Benetti, A., Alessandri, G., Ribatti, D., et al. (2012). HIV-1 matrix protein p17 promotes angiogenesis via chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14580–14585. doi:10.1073/pnas.1206605109.

- Caccuri, F., Giagulli, C., Reichelt, J., Martorelli, D., Marsico, S., Bugatti, A., et al. (2014). Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 matrix proteins specify different capabilities to modulate B cell growth. *Journal of Virology* 88, 5706–5717. doi:10.1128/JVI.03142-13.
- Cader, F. Z., Vockerodt, M., Bose, S., Nagy, E., Brundler, M.-A., Kearns, P., et al. (2013). The EBV oncogene LMP1 protects lymphoma cells from cell death through the collagen-mediated activation of DDR1. *Blood* 122, 4237–4245. doi:10.1182/blood-2013-04-499004.
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., et al. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat. Med.* 2, 906–911. doi:10.1038/nm0896-906.
- Carbone, A., and Gloghini, A. (2013). Activated DDR1 increases RS cell survival. *Blood* 122, 4152–4154. doi:10.1182/blood-2013-11-534123.
- Cederberg, L. E., Rabinovitch, M. D., Grimm-Geris, J. M., Schmeling, D. O., Filtz, E. A., Condon, L. M., et al. (2019). Epstein-Barr Virus DNA in Parental Oral Secretions: A Potential Source of Infection for Their Young Children. *Clinical Infectious Diseases* 68, 306–312. doi:10.1093/cid/ciy464.
- Chan, K. H., Tam, J. S., Peiris, J. S., Seto, W. H., and Ng, M. H. (2001). Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy. *J. Clin. Virol.* 21, 57–62.
- Chattopadhyay, P. K., Chelimo, K., Embury, P. B., Mulama, D. H., Sumba, P. O., Gostick, E., et al. (2013). Holoendemic malaria exposure is associated with altered Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell differentiation. *Journal of Virology* 87, 1779–1788. doi:10.1128/JVI.02158-12.
- Chetaille, B., Bertucci, F., Finetti, P., Esterni, B., Stamatoullas, A., Picquenot, J. M., et al. (2009). Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood* 113, 2765–3775. doi:10.1182/blood-2008-07-168096.
- Chiappini, E., Galli, L., Tovo, P.-A., Gabiano, C., Lisi, C., Giaquinto, C., et al. (2007). Cancer rates after year 2000 significantly decrease in children with perinatal HIV infection: a study by the Italian Register for HIV Infection in Children. *J Clin Oncol* 25, 97–101. doi:10.1200/JCO.2006.06.6506.
- Chirivi, R. G., Taraboletti, G., Bani, M. R., Barra, L., Piccinini, G., Giacca, M., et al. (1999). Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-Tat protein promotes migration of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cells and enhances their adhesion to endothelial cells. *Blood* 94, 1747–1754.
- Christian, L. M., Iams, J. D., Porter, K., and Glaser, R. (2012). Epstein-Barr virus reactivation during pregnancy and postpartum: Effects of race and racial discrimination. *Brain Behav. Immun.* 26, 1280–1287. doi:10.1016/j.bbi.2012.08.006.



- Cleary, M. L., Smith, S. D., and Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 19–28. doi:10.1016/0092-8674(86)90362-4.
- Clute, S. C., Naumov, Y. N., Watkin, L. B., Aslan, N., Sullivan, J. L., Thorley-Lawson, D. A., et al. (2010). Broad cross-reactive TCR repertoires recognizing dissimilar Epstein-Barr and influenza A virus epitopes. *J. Immunol.* 185, 6753–6764. doi:10.4049/jimmunol.1000812.
- Coghill, A. E., and Hildesheim, A. (2014). Epstein-Barr virus antibodies and the risk of associated malignancies: review of the literature. *American Journal of Epidemiology* 180, 687–695. doi:10.1093/aje/kwu176.
- Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr Virus Infection. *N Engl J Med* 343, 481–492. doi:10.1056/NEJM200008173430707.
- Cohen, J. I. (2018). Vaccine Development for Epstein-Barr Virus. *Adv Exp Med Biol* 1045, 477–493. doi:10.1007/978-981-10-7230-7\_22.
- Cohen, J. I., Fauci, A. S., Varmus, H., and Nabel, G. J. (2011). Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med* 3, 107fs7. doi:10.1126/scitranslmed.3002878.
- Coleman, C. B., Daud, I. I., Ogolla, S. O., Ritchie, J. A., Smith, N. A., Sumba, P. O., et al. (2017). Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells in Healthy Kenyan Children. *J Infect Dis* 216, 670–677. doi:10.1093/infdis/jix363.
- Coleman, C. B., Lang, J., Sweet, L. A., Smith, N. A., Freed, B. M., Pan, Z., et al. (2018). Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells and Induces B Cell Lymphomagenesis in Humanized Mice. *Journal of Virology* 92. doi:10.1128/JVI.00813-18.
- Condon, L. M., Cederberg, L. E., Rabinovitch, M. D., Liebo, R. V., Go, J. C., Delaney, A. S., et al. (2014). Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among Minnesota children: effects of race/ethnicity and family environment. *Clinical Infectious Diseases* 59, 501–508. doi:10.1093/cid/ciu342.
- Cumberland, P., Shulman, C. E., Chris Maple, P. A., Bulmer, J. N., Dorman, E. K., Kawuondo, K., et al. (2007). Maternal HIV Infection and Placental Malaria Reduce Transplacental Antibody Transfer and Tetanus Antibody Levels in Newborns in Kenya. *J Infect Dis* 196, 550–557. doi:10.1086/519845.
- Das, S., Ongusaha, P. P., Yang, Y. S., Park, J.-M., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. (2006). Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kappaB pathway activation. *Cancer Res* 66, 8123–8130. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1215.
- Daud, I. I. (2015). *Effect of Plasmodium falciparum Malaria on Epstein Barr Virus (EBV) Reactivation during Pregnancy and Subsequent Shedding of EBV in Breast milk Postpartum.*

- Daud, I. I., Coleman, C. B., Smith, N. A., Ogolla, S., Simbiri, K., Bukusi, E. A., et al. (2015). Breast Milk as a Potential Source of Epstein-Barr Virus Transmission Among Infants Living in a Malaria-Endemic Region of Kenya. *J Infect Dis* 212, 1735–1742. doi:10.1093/infdis/jiv290.
- Daud, I. I., Ogolla, S., Amolo, A. S., Namuyenga, E., Simbiri, K., Bukusi, E. A., et al. (2014). *Plasmodium falciparum* Infection is Associated with Epstein-Barr Virus Reactivation in Pregnant Women Living in Malaria Holoendemic Area of Western Kenya. *Matern Child Health J* 19, 606–614. doi:10.1007/s10995-014-1546-4.
- Davidson, A., Wainwright, R. D., Stones, D. K., Kruger, M., Hendricks, M., Geel, J., et al. (2014). Malignancies in South African children with HIV. *J Pediatr Hematol Oncol* 36, 111–117. doi:10.1097/MPH.0b013e31829cdd49.
- de-The, G. (1979). The epidemiology of Burkitt's lymphoma: evidence for a causal association with Epstein-Barr virus. *Epidemiol Rev* 1, 32–54. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036213.
- de-The, G., Day, N. E., Geser, A., Lavoue, M. F., Ho, J. H., Simons, M. J., et al. (1975). Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus: preliminary analysis of an international study - a review. *IARC Sci Publ*, 3–16.
- de-The, G., Geser, A., Day, N. E., Tukei, P. M., Williams, E. H., Beri, D. P., et al. (1978). Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 274, 756–761. doi:10.1038/274756a0.
- Deeken, J. F., Tjen-A-Looi, A., Rudek, M. A., Okuliar, C., Young, M., Little, R. F., et al. (2012). The rising challenge of non-AIDS-defining cancers in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases* 55, 1228–1235. doi:10.1093/cid/cis613.
- Diamond, C., Taylor, T. H., Aboumrad, T., and Anton-Culver, H. (2006). Changes in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy: incidence, presentation, treatment, and survival. *Cancer* 106, 128–135. doi:10.1002/cncr.21562.
- Diehl, V., Henle, G., Henle, W., and Kohn, G. (1968). Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis. *Journal of Virology* 2, 663–669. doi:10.1128/JVI.2.7.663-669.1968.
- Dolcetti, R., Gloghini, A., Caruso, A., and Carbone, A. (2016). A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood* 127, 1403–1409. doi:10.1182/blood-2015-11-681411.
- Donati, D., Espmark, E., Kironde, F., Mbidde, E. K., Kanya, M., Lundkvist, A., et al. (2006). Clearance of circulating Epstein-Barr virus DNA in children with acute malaria after antimalaria treatment. *J Infect Dis* 193, 971–977. doi:10.1086/500839.

- Donati, D., Zhang, L. P., Chen, Q., Chêne, A., Flick, K., Nyström, M., et al. (2004). Identification of a Polyclonal B-Cell Activator in *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity* 72, 5412–5418. doi:10.1128/IAI.72.9.5412-5418.2004.
- Draborg, A. H., Duus, K., and Houen, G. (2013). Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2013, 535738. doi:10.1155/2013/535738.
- Dunmire, S. K., Verghese, P. S., and Balfour, H. H. J. (2018). Primary Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Virol.* 102, 84–92. doi:10.1016/j.jcv.2018.03.001.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274, 16085–16096. doi:10.1074/jbc.274.23.16085.
- Enbom, M., Strand, A., Falk, K. I., and Linde, A. (2001). Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* 28, 300–306. doi:10.1097/00007435-200105000-00013.
- Epeldegui, M., Breen, E. C., Hung, Y. P., Boscardin, W. J., Detels, R., and Martínez-Maza, O. (2007). Elevated expression of activation induced cytidine deaminase in peripheral blood mononuclear cells precedes AIDS-NHL diagnosis. *AIDS* 21, 2265–2270. doi:10.1097/QAD.0b013e3282ef9f59.
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G., and BARR, Y. M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *The Lancet* 1, 702–703. doi:10.1016/s0140-6736(64)91524-7.
- Epstein, A. (2012). Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein-Barr virus. *Br. J. Haematol.* 156, 777–779. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09008.x.
- Evans, C., Jones, C. E., and Prendergast, A. J. (2016). HIV-exposed, uninfected infants: new global challenges in the era of paediatric HIV elimination. *The Lancet Infectious Diseases* 16, e92–e107. doi:10.1016/S1473-3099(16)00055-4.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Barranger, C., Bargues, G., Magro, S., Bes, J., et al. (2008). Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. *The Journal of Molecular Diagnostics* 10, 78–84. doi:10.2353/jmoldx.2008.070054.
- Fernández-Menéndez, S., Fernández-Morán, M., Fernández-Vega, I., Pérez-Álvarez, A., and Villafani-Echazú, J. (2016). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. From evidence to therapeutic strategies. *J Neurol Sci* 361, 213–219. doi:10.1016/j.jns.2016.01.013.
- Figueira-Silva, C. M., and Pereira, F. E. L. (2004). Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37, 409–412. doi:10.1590/s0037-86822004000500008.

- Filteau, S. (2009). The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Health* 14, 276–287. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02220.x.
- Fleisher, G., Henle, W., Henle, G., Lennette, E. T., and Biggar, R. J. (1979). Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *J Infect Dis* 139, 553–558. doi:10.1093/infdis/139.5.553.
- Fourcade, G., Germi, R., Guerber, F., Lupo, J., Baccard, M., Seigneurin, A., et al. (2017). Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. *PLoS ONE* 12, e0175574. doi:10.1371/journal.pone.0175574.
- Gantt, S., Carlsson, J., Shetty, A. K., Seidel, K. D., Qin, X., Mutsvangwa, J., et al. (2008). Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Breast Milk are Associated with HIV-1 Shedding but Not With Mastitis. *AIDS* 22, 1453–1460. doi:10.1097/QAD.0b013e32830184f2.
- Gantt, S., Orem, J., Krantz, E. M., Morrow, R. A., Selke, S., Huang, M.-L., et al. (2016). Prospective Characterization of the Risk Factors for Transmission and Symptoms of Primary Human Herpesvirus Infections Among Ugandan Infants. *J Infect Dis* 214, 36–44. doi:10.1093/infdis/jiw076.
- Garcia-Peris, M., Jimenez Candel, M. I., Manes Jimenez, Y., Pariente Marti, M., Gonzalez Granda, D., and Calvo Rigual, F. (2019). [Epstein-Barr virus primary infection in healthy children]. *An Pediatr (Barc)* 90, 376–385. doi:10.1016/j.anpedi.2018.09.003.
- Glaser, R., Pearson, G. R., Jones, J. F., Hillhouse, J., Kennedy, S., Mao, H. Y., et al. (1991). Stress-related activation of Epstein-Barr virus. *Brain Behav. Immun.* 5, 219–232. doi:10.1016/0889-1591(91)90018-6.
- Glaser, S. L., Lin, R. J., Stewart, S. L., Ambinder, R. F., Jarrett, R. F., Brousset, P., et al. (1997). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 70, 375–382. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970207)70:4<375::aid-ijc1>3.0.co;2-t.
- Gotti, D., Danesi, M., Calabresi, A., Ferraresi, A., Albin, L., Donato, F., et al. (2013). Clinical characteristics, incidence, and risk factors of HIV-related Hodgkin lymphoma in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care and STDs* 27, 259–265. doi:10.1089/apc.2012.0424.
- Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Petersen, V., et al. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral “hairy” leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313, 1564–1571. doi:10.1056/NEJM198512193132502.
- Grimm, J. M., Schmeling, D. O., Dunmire, S. K., Knight, J. A., Mullan, B. D., Ed, J. A., et al. (2016). Prospective studies of infectious mononucleosis in university students. *Clin Transl Immunology* 5, e94. doi:10.1038/cti.2016.48.

- Grose, C., and Johanson, D. C. (2016). Transmission of Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Herpes Simplex Virus Infections: From the Lucy Australopithecus Epoch to Modern-Day Netherlands. *J. Pediatr.* 170, 9–10. doi:10.1016/j.jpeds.2015.12.005.
- Gulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O., and Vajdic, C. M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370, 59–67. doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2.
- Gumbo, H., Chasekwa, B., Church, J. A., Ntozini, R., Mutasa, K., Humphrey, J. H., et al. (2005). Congenital and Postnatal CMV and EBV Acquisition in HIV-Infected Zimbabwean Infants. *PLoS ONE* 9, e114870. doi:10.1371/journal.pone.0114870.
- Gumbo, H., Chasekwa, B., Church, J. A., Ntozini, R., Mutasa, K., Humphrey, J. H., et al. (2014). Congenital and Postnatal CMV and EBV Acquisition in HIV-Infected Zimbabwean Infants. *PLoS ONE* 9, e114870. doi:10.1371/journal.pone.0114870.
- Haeri, S., Baker, A. M., and Boggess, K. A. (2010). Prevalence of Epstein-Barr virus reactivation in pregnancy. *Amer J Perinatol* 27, 715–719. doi:10.1055/s-0030-1253098.
- Haeri, S., Johnson, N., Baker, A. M., Stuebe, A. M., Raines, C., Barrow, D. A., et al. (2011). Maternal depression and Epstein-Barr virus reactivation in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 117, 862–866.
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S. V. (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS ONE* 5, e12496. doi:10.1371/journal.pone.0012496.
- Hausen, zur, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., et al. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056–1058. doi:10.1038/2281056a0.
- Henle, G., and Henle, G. (1979). *Henle, W.; Henle, G. Seroepidemiology of the virus. In: Epstein, MA.; Achong, BG., editors. The Epstein-Barr virus. Berlin: Springer; 1979.*
- Hernández-Ramírez, R. U., Shiels, M. S., Dubrow, R., and Engels, E. A. (2017). Cancer risk in HIV-infected people in the USA from 1996 to 2012: a population-based, registry-linkage study. *Lancet HIV* 4, e495–e504. doi:10.1016/S2352-3018(17)30125-X.
- Hess, R. D. (2004). Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3381–3387. doi:10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., and Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25, 587–617. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553.

- Hjalgrim, H., Smedby, K. E., Rostgaard, K., Molin, D., Hamilton-Dutoit, S., Chang, E. T., et al. (2007). Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 67, 2382–2388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3566.
- Hleyhel, M., Belot, A., Bouvier, A. M., Tattevin, P., Pacanowski, J., Genet, P., et al. (2013). Risk of AIDS-defining cancers among HIV-1-infected patients in France between 1992 and 2009: results from the FHDH-ANRS CO4 cohort. *Clinical Infectious Diseases* 57, 1638–1647. doi:10.1093/cid/cit497.
- Hleyhel, M., Goujon, S., Delteil, C., Vasiljevic, A., Luzi, S., Stephan, J.-L., et al. (2016). Risk of cancer in children exposed to didanosine in utero. *AIDS* 30, 1245–1256. doi:10.1097/QAD.0000000000001051.
- Ho, M., Jaffe, R., Miller, G., Breinig, M. K., Dummer, J. S., Makowka, L., et al. (1988). The frequency of Epstein-Barr virus infection and associated lymphoproliferative syndrome after transplantation and its manifestations in children. *Transplantation* 45, 719–727. doi:10.1097/00007890-198804000-00011.
- Honke, N., Shaabani, N., Merches, K., Gassa, A., Kraft, A., Ehrhardt, K., et al. (2016). Immunoactivation induced by chronic viral infection inhibits viral replication and drives immunosuppression through sustained IFN-I responses. *European Journal of Immunology* 46, 372–380. doi:10.1002/eji.201545765.
- Hsu, D. H., de Waal Malefyt, R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Vieira, P., de Vries, J., et al. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250, 830–832. doi:10.1126/science.2173142.
- Huynh, G. T., and Adler, F. R. (2012). Mathematical modelling the age dependence of Epstein-Barr virus associated infectious mononucleosis. *Math Med Biol* 29, 245–261. doi:10.1093/imammb/dqr007.
- Isabel de Moraes-Pinto, M., Almeida, A. C. M., Kenj, G., Filgueiras, T. E., Tobias, W., Santos, A. M. N., et al. (1996). Placental Transfer and Maternally Acquired Neonatal IgG Immunity in Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis* 173, 1077–1084. doi:10.1093/infdis/173.5.1077.
- Ivy, W. 3., Nesheim, S. R., Paul, S. M., Ibrahim, A. R., Chan, M., Niu, X., et al. (2015). Cancer Among Children With Perinatal Exposure to HIV and Antiretroviral Medications--New Jersey, 1995-2010. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 70, 62–66. doi:10.1097/QAI.0000000000000695.
- Jansen, M. A. E., van den Heuvel, D., Bouthoorn, S. H., Jaddoe, V. W. V., Hooijkaas, H., Raat, H., et al. (2016). Determinants of Ethnic Differences in Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Herpes Simplex Virus Type 1 Seroprevalence in Childhood. *J. Pediatr.* 170, 126–34.e1–6. doi:10.1016/j.jpeds.2015.11.014.

- Jayasooriya, S., de Silva, T. I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A. M., Bell, A. I., et al. (2015). Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children. *PLoS Pathog* 11, e1004746.
- Jenson, H. (2006). *Jenson HB., T.A., 2006. Epstein-Barr Virus, 1st ed. Taylor & Francis, New York, NY.*
- Jenson, H., McIntosh, K., Pitt, J., Husak, S., Tan, M., Bryson, Y., et al. (1999). Natural history of primary Epstein-Barr virus infection in children of mothers infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 179, 1395–1404. doi:10.1086/314764.
- Jones, C. E., Naidoo, S., De Beer, C., Esser, M., Kampmann, B., and Hesselting, A. C. (2011). Maternal HIV Infection and Antibody Responses Against Vaccine-Preventable Diseases in Uninfected Infants. *JAMA* 305, 576–584. doi:10.1001/jama.2011.100.
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. R., Sciotto, C. G., Wahl, R., et al. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 318, 733–741. doi:10.1056/NEJM198803243181203.
- Junker, A. K., Ochs, H. D., Clark, E. A., Puterman, M. L., and Wedgwood, R. J. (1986). Transient immune deficiency in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *Clinical Immunology and Immunopathology* 40, 436–446. doi:10.1016/0090-1229(86)90188-1.
- Junker, A. K., Thomas, E. E., Radcliffe, A., Forsyth, R. B., Davidson, A. G. F., and Rymo, L. (1991). Epstein-Barr Virus Shedding in Breast Milk. *The American Journal of the Medical Sciences* 302, 220–223. doi:10.1097/00000441-199110000-00005.
- Kanakry, J. A., Li, H., Gellert, L. L., Lemas, M. V., Hsieh, W.-S., Hong, F., et al. (2013). Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood* 121, 3547–3553. doi:10.1182/blood-2012-09-454694.
- Kang, M.-S., and Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 47, e131–e131. doi:10.1038/emm.2014.84.
- Kaspersen, M. D., Larsen, P. B., Kofod-Olsen, E., Fedder, J., Bonde, J., and Hollsberg, P. (2012). Human herpesvirus-6A/B binds to spermatozoa acrosome and is the most prevalent herpesvirus in semen from sperm donors. *PLoS ONE* 7, e48810.
- Kerr, J. R. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol* 72, 651–658. doi:10.1136/jclinpath-2019-205822.
- Klenerman, P., and Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature Immunology* 2005 6:9 6, 873–879. doi:10.1038/ni1241.

- Kuzembayeva, M., Hayes, M., and Sugden, B. (2014). Multiple functions are mediated by the miRNAs of Epstein-Barr virus. *Current Opinion in Virology* 7, 61–65. doi:10.1016/j.coviro.2014.04.003.
- Laichalk, L. L., and Thorley-Lawson, D. A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *Journal of Virology* 79, 1296–1307. doi:10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005.
- Lam, K. M., Syed, N., Whittle, H., and Crawford, D. H. (1991). Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *The Lancet* 337, 876–878. doi:10.1016/0140-6736(91)90203-2.
- Lam, K. P., and Rajewsky, K. (1998). Rapid elimination of mature autoreactive B cells demonstrated by Cre-induced change in B cell antigen receptor specificity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13171–13175. doi:10.1073/pnas.95.22.13171.
- le Roux, S. M., Abrams, E. J., Donald, K. A., Brittain, K., Phillips, T. K., Nguyen, K. K., et al. (2019). Growth trajectories of breastfed HIV-exposed uninfected and HIV-unexposed children under conditions of universal maternal antiretroviral therapy: a prospective study. *Lancet Child Adolesc Health* 3, 234–244. doi:10.1016/S2352-4642(19)30007-0.
- le Roux, S. M., Abrams, E. J., Nguyen, K., and Myer, L. (2016). Clinical outcomes of HIV-exposed, HIV-uninfected children in sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health* 21, 829–845. doi:10.1111/tmi.12716.
- Li, Q., Spriggs, M. K., Kovats, S., Turk, S. M., Comeau, M. R., Nepom, B., et al. (1997). Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *Journal of Virology* 71, 4657–4662. doi:10.1128/JVI.71.6.4657-4662.1997.
- Ling, P. D., Vilchez, R. A., Keitel, W. A., Poston, D. G., Peng, R. S., White, Z. S., et al. (2003). Epstein-Barr virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases* 37, 1244–1249. doi:10.1086/378808.
- MacMahon, E. M., Glass, J. D., Hayward, S. D., Mann, R. B., Becker, P. S., Charache, P., et al. (1991). Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *The Lancet* 338, 969–973. doi:10.1016/0140-6736(91)91837-k.
- Macswain, K. F., and Crawford, D. H. (2003). Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 131–140. doi:10.1016/s1473-3099(03)00543-7.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., and Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of “crippled” germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339–4344. doi:10.1182/blood-2005-06-2341.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H. D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., et al. (2000). Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone



- originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95, 1443–1450.
- Martorelli, D., Muraro, E., Mastorci, K., Dal Col, J., Faè, D. A., Furlan, C., et al. (2015). A natural HIV p17 protein variant up-regulates the LMP-1 EBV oncoprotein and promotes the growth of EBV-infected B-lymphocytes: implications for EBV-driven lymphomagenesis in the HIV setting. *Int J Cancer* 137, 1374–1385. doi:10.1002/ijc.29494.
- Matrajt, L., Gantt, S., Mayer, B. T., Krantz, E. M., Orem, J., Wald, A., et al. (2017). Virus and host-specific differences in oral human herpesvirus shedding kinetics among Ugandan women and children. *Sci Rep* 7, 13105. doi:10.1038/s41598-017-12994-0.
- Maurmann, S., Fricke, L., Wagner, H.-J., Schlenke, P., Hennig, H., Steinhoff, J., et al. (2003). Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5419–5428. doi:10.1128/jcm.41.12.5419-5428.2003.
- McHenry, M. S., McAteer, C. I., Oyungu, E., McDonald, B. C., Bosma, C. B., Mporfu, P. B., et al. (2018). Neurodevelopment in Young Children Born to HIV-Infected Mothers: A Meta-analysis. *Pediatrics* 141. doi:10.1542/peds.2017-2888.
- Melbye, M., Ebbesen, P., Levine, P. H., and Bennike, T. (1984). Early primary infection and high Epstein-Barr virus antibody titers in Greenland Eskimos at high risk for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 34, 619–623. doi:10.1002/ijc.2910340506.
- Melchers, F. (2015). Checkpoints that control B cell development. *J Clin Invest* 125, 2203–2210. doi:10.1172/JCI78083.
- Miller, G., and Lipman, M. (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 190–194. doi:10.1073/pnas.70.1.190.
- Minhas, V., Brayfield, B. P., Crabtree, K. L., Kankasa, C., Mitchell, C. D., and Wood, C. (2010). Primary gamma-herpesviral infection in Zambian children. *BMC Infectious Diseases* 10, 115. doi:10.1186/1471-2334-10-115.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *Journal of Virology* 71, 4882–4891. doi:10.1128/JVI.71.7.4882-4891.1997.
- Moghaddam, A., Rosenzweig, M., Lee-Parritz, D., Annis, B., Johnson, R. P., and Wang, F. (1997). An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science* 276, 2030–2033. doi:10.1126/science.276.5321.2030.
- Molyneux, E. M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., et al. (2012). Burkitt's lymphoma. *The Lancet* 379, 1234–1244. doi:10.1016/S0140-6736(11)61177-X.

- Moormann, A. M., and Bailey, J. A. (2016). Malaria — how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Current Opinion in Virology* 20, 78–84. doi:10.1016/j.coviro.2016.09.006.
- Moormann, A. M., Chelimo, K., Sumba, O. P., Lutzke, M. L., Ploutz-Snyder, R., Newton, D., et al. (2005). Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis* 191, 1233–1238. doi:10.1086/428910.
- Moormann, A. M., Chelimo, K., Sumba, P. O., Tisch, D. J., Rochford, R., and Kazura, J. W. (2007). Exposure to holoendemic malaria results in suppression of Epstein-Barr virus-specific T cell immunosurveillance in Kenyan children. *J Infect Dis* 195, 799–808. doi:10.1086/511984.
- Moss, D. J., and Lutzky, V. P. (2015). EBV-Specific Immune Response: Early Research and Personal Reminiscences. *Curr Top Microbiol Immunol* 390, 23–42. doi:10.1007/978-3-319-22822-8\_3.
- Mueller, N., Evans, A., Harris, N. L., Comstock, G. W., Jellum, E., Magnus, K., et al. (1989). Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 320, 689–695. doi:10.1056/NEJM198903163201103.
- Mutalima, N., Molyneux, E. M., Johnston, W. T., Jaffe, H. W., Kamiza, S., Borgstein, E., et al. (2010). Impact of infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV) on the risk of cancer among children in Malawi - preliminary findings. *Infect. Agents Cancer* 5, 5. doi:10.1186/1750-9378-5-5.
- Nagot, N., Kankasa, C., Tumwine, J. K., Meda, N., Hofmeyr, G. J., Vallo, R., et al. (2016). Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir–ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): a randomised controlled trial. *The Lancet* 387, 566–573. doi:10.1016/S0140-6736(15)00984-8.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of Virology* 61, 1416–1420. doi:10.1128/JVI.61.5.1416-1420.1987.
- Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R. (1985). Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *Journal of Virology* 55, 347–351. doi:10.1128/JVI.55.2.347-351.1985.
- Neofytou, E., Sourvinos, G., Asmarianaki, M., Spandidos, D. A., and Makrigrannakis, A. (2009). Prevalence of human herpes virus types 1-7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil Steril* 91, 2487–2494. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.03.074.

- Newton, R., Ziegler, J., Beral, V., Mbidde, E., Carpenter, L., Wabinga, H., et al. (2001). A case-control study of human immunodeficiency virus infection and cancer in adults and children residing in Kampala, Uganda. *Int J Cancer* 92, 622–627. doi:10.1002/1097-0215(20010601)92:5<622::aid-ijc1256>3.0.co;2-k.
- Nielsen, T. R., Rostgaard, K., Nielsen, N. M., Koch-Henriksen, N., Haahr, S., Sørensen, P. S., et al. (2007). Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 64, 72–75. doi:10.1001/archneur.64.1.72.
- Ogolla, S., Daud, I. I., Asito, A. S., Sumba, O. P., Ouma, C., Vulule, J., et al. (2015). Reduced Transplacental Transfer of a Subset of Epstein-Barr Virus-Specific Antibodies to Neonates of Mothers Infected with Plasmodium falciparum Malaria during Pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 22, 1197–1205. doi:10.1128/CVI.00270-15.
- Okoko, B. J., Wesumperuma, L. H., Ota, M. O., Pinder, M., Banya, W., Gomez, S. F., et al. (2001). The influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinemia on transplacental transfer of antibodies and IgG subclasses in a rural West African population. *J Infect Dis* 184, 627–632. doi:10.1086/322808.
- Oliveira, L. H. S., Santos, L. S., and Nogueira, F. G. (2011). Epstein Barr virus detection in cervical samples of women living with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 53, 231–234. doi:10.1590/s0036-46652011000400011.
- Oropallo, M. A., and Cerutti, A. (2014). Germinal center reaction: antigen affinity and presentation explain it all. *Trends Immunol.* 35, 287–289. doi:10.1016/j.it.2014.06.001.
- Orozco, A. F., Jorgez, C. J., Horne, C., Marquez-Do, D. A., Chapman, M. R., Rodgers, J. R., et al. (2008). Membrane Protected Apoptotic Trophoblast Microparticles Contain Nucleic Acids: Relevance to Preeclampsia. *The American Journal of Pathology* 173, 1595–1608. doi:10.2353/ajpath.2008.080414.
- Ouedraogo, D. E., Makinson, A., Vendrell, J.-P., Casanova, M.-L., Nagot, N., Cezar, R., et al. (2013). Pivotal role of HIV and EBV replication in the long-term persistence of monoclonal gammopathy in patients on antiretroviral therapy. *Blood* 122, 3030–3033. doi:10.1182/blood-2012-12-470393.
- Ouedraogo, D. E., Tuailon, E., Rubbo, P.-A., Bollore, K., Foulongne, V., Reynes, J., et al. (2014). Close relationship between immunoglobulin secreting-cells and Epstein-Barr virus reservoir in patients infected with HIV. *J Med Virol* 86, 30–37. doi:10.1002/jmv.23762.
- Pathmanathan, R., Prasad, U., Sadler, R., Flynn, K., and Raab-Traub, N. (1995). Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 333, 693–698. doi:10.1056/NEJM199509143331103.
- Paya, C. V., Fung, J. J., Nalesnik, M. A., Kieff, E., Green, M., Gores, G., et al. (1999). Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-

PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. in, 1517–1525. doi:10.1097/00007890-199911270-00015.

- Pedneault, L., Lapointe, N., Alfieri, C., Ghadirian, P., Carpentier, L., Samson, J., et al. (1998). Natural history of Epstein-Barr virus infection in a prospective pediatric cohort born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *J Infect Dis* 177, 1087–1090.
- Pembrey, L., Waiblinger, D., Griffiths, P., and Wright, J. (2019). Age at cytomegalovirus, Epstein Barr virus and varicella zoster virus infection and risk of atopy: The Born in Bradford cohort, UK. *Pediatr Allergy Immunol* 30, 604–613. doi:10.1111/pai.13093.
- Peprah, S., Ogwang, M. D., Kerchan, P., Reynolds, S. J., Tenge, C. N., Were, P. A., et al. (2020). Risk factors for Burkitt lymphoma in East African children and minors: A case-control study in malaria-endemic regions in Uganda, Tanzania and Kenya. *Int J Cancer* 146, 953–969. doi:10.1002/ijc.32390.
- Petrara, M. R., Cattelan, A. M., Zanchetta, M., Sasset, L., Freguja, R., Gianesin, K., et al. (2012). Epstein-Barr virus load and immune activation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Clin. Virol.* 53, 195–200. doi:10.1016/j.jcv.2011.12.013.
- Petrara, M. R., Freguja, R., Gianesin, K., Zanchetta, M., and De Rossi, A. (2013). Epstein-Barr virus-driven lymphomagenesis in the context of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Front Microbiol* 4, 311. doi:10.3389/fmicb.2013.00311.
- Petrara, M. R., Penazzato, M., Massavon, W., Nabachwa, S., Nannyonga, M., Mazza, A., et al. (2014). Epstein-Barr Virus Load in Children Infected With Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Uganda. *J Infect Dis* 210, 392–399. doi:10.1093/infdis/jiu099.
- Piriou, E., Asito, A. S., Sumba, P. O., Fiore, N., Middeldorp, J. M., Moormann, A. M., et al. (2012). Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. *J Infect Dis* 205, 906–913. doi:10.1093/infdis/jir872.
- Piriou, E., Kimmel, R., Chelimo, K., Middeldorp, J. M., Odada, P. S., Snyder, R. P., et al. (2009). Serological evidence for long-term Epstein-Barr virus reactivation in children living in a holoendemic malaria region of Kenya. *J Med Virol* 81, 1088–1093. doi:10.1002/jmv.21485.
- Pitt, J., Schluchter, M., Jenson, H., Kovacs, A., LaRussa, P., McIntosh, K., et al. (1998). Maternal and perinatal factors related to maternal-infant transmission of HIV-1 in the P2C2 HIV study: the role of EBV shedding. Pediatric Pulmonary and Cardiovascular Complications of Vertically Transmitted HIV-1 Infection (P2C2 HIV) Study Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 19, 462–470. doi:10.1097/00042560-199812150-00004.

- Pope, J. H., Horne, M. K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human keukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 3, 857–866. doi:10.1002/ijc.2910030619.
- Rahman, M. A., Kingsley, L. A., Atchison, R. W., Belle, S., Breinig, M. C., Ho, M., et al. (1991). Reactivation of Epstein-Barr virus during early infection with human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 1215–1220. doi:10.1128/JCM.29.6.1215-1220.1991.
- Rainey, J. J., Mwanda, W. O., Wairiumu, P., Moormann, A. M., Wilson, M. L., and Rochford, R. (2007). Spatial distribution of Burkitt's lymphoma in Kenya and association with malaria risk. *Trop Med Int Health* 12, 936–943. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01875.x.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K. M., et al. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature* 440, 105–109. doi:10.1038/nature04495.
- Rees, C. A., Keating, E. M., Lukolyo, H., Danysh, H. E., Scheurer, M. E., Mehta, P. S., et al. (2016). Mapping the Epidemiology of Kaposi Sarcoma and Non-Hodgkin Lymphoma Among Children in Sub-Saharan Africa: A Review. *Pediatr Blood Cancer* 63, 1325–1331. doi:10.1002/pbc.26021.
- Reikie, B. A., Naidoo, S., Ruck, C. E., Slogrove, A. L., De Beer, C., la Grange, H., et al. (2013). Antibody responses to vaccination among South African HIV-exposed and unexposed uninfected infants during the first 2 years of life. *Clin Vaccine Immunol* 20, 33–38. doi:10.1128/CVI.00557-12.
- Renné, C., Hirsch, N., Willenbrock, K., Fuchs, M., Klapper, W., Engert, A., et al. (2007). The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 120, 2504–2509. doi:10.1002/ijc.22511.
- Reynaldi, A., Schlub, T. E., Piriou, E., Ogolla, S., Sumba, O. P., Moormann, A. M., et al. (2016). Modeling of EBV Infection and Antibody Responses in Kenyan Infants With Different Levels of Malaria Exposure Shows Maternal Antibody Decay is a Major Determinant of Early EBV Infection. *J Infect Dis* 214, 1390–1398. doi:10.1093/infdis/jiw396.
- Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Münz, C., and Hislop, A. D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 35, 159–169. doi:10.1016/j.it.2014.01.003.
- Rickinson, A. B., Young, L. S., and Rowe, M. (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *Journal of Virology* 61, 1310–1317. doi:10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987.

- Rochford, R., Cannon, M. J., and Moormann, A. M. (2005). Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nature Reviews Microbiology* 2005 3:2 3, 182–187. doi:10.1038/nrmicro1089.
- Roizman, B. *Bernard Roizman, P.E.P., 2013. David M. Knipe, Peter M. Howley (Eds), Fields Virology, 6th ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business, Philadelphia, PA 19103 USA.*
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., et al. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16, 201–217. doi:10.1159/000149269.
- Rosala-Hallas, A., Bartlett, J. W., and Filteau, S. (2017). Growth of HIV-exposed uninfected, compared with HIV-unexposed, Zambian children: a longitudinal analysis from infancy to school age. *BMC Pediatr* 17, 80. doi:10.1186/s12887-017-0828-6.
- Rostgaard, K., Balfour, H. H. J., Jarrett, R., Erikstrup, C., Pedersen, O., Ullum, H., et al. (2019). Primary Epstein-Barr virus infection with and without infectious mononucleosis. *PLoS ONE* 14, e0226436.
- Rouet, F., Ekouevi, D. K., Chaix, M.-L., Burgard, M., Inwoley, A., Tony, T. D., et al. (2005). Transfer and evaluation of an automated, low-cost real-time reverse transcription-PCR test for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection in a West African resource-limited setting. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2709–2717. doi:10.1128/JCM.43.6.2709-2717.2005.
- Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H., et al. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.* 6, 2743–2751.
- Ruck, C., Reikie, B. A., Marchant, A., Kollmann, T. R., and Kakkar, F. (2016). Linking Susceptibility to Infectious Diseases to Immune System Abnormalities among HIV-Exposed Uninfected Infants. *Front Immunol* 7, 757. doi:10.3389/fimmu.2016.00310.
- Ruperez, M., Gonzalez, R., Maculuvé, S., Quinto, L., Lopez-Varela, E., Augusto, O., et al. (2017). Maternal HIV infection is an important health determinant in non-HIV-infected infants. *AIDS* 31, 1545–1553.
- Saha, A., and Robertson, E. S. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology* 93. doi:10.1128/JVI.00238-19.
- Sanosyan, A., Rutagwera, D. G., Moles, J.-P., Bollore, K., Peries, M., Kankasa, C., et al. (2016). Increased Epstein-Barr virus in breast milk occurs with subclinical mastitis and HIV shedding. *Medicine (Baltimore)* 95, e4005.
- Sashihara, J., Burbelo, P. D., Savoldo, B., Pierson, T. C., and Cohen, J. I. (2009). Human antibody titers to Epstein-Barr Virus (EBV) gp350 correlate with neutralization of

- infectivity better than antibody titers to EBV gp42 using a rapid flow cytometry-based EBV neutralization assay. *Virology* 391, 249–256. doi:10.1016/j.virol.2009.06.013.
- Scherrenburg, J., Piriou, E. R. W. A. N., Nanlohy, N. M., and Van Baarle, D. (2008). Detailed analysis of Epstein–Barr virus-specific CD4+ and CD8+ T cell responses during infectious mononucleosis. *Clinical & Experimental Immunology* 153, 231–239. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03699.x.
- Shapiro, R. S., McClain, K., Frizzera, G., Gajl-Peczalska, K. J., Kersey, J. H., Blazar, B. R., et al. (1988). Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 71, 1234–1243.
- Simard, E. P., Shiels, M. S., Bhatia, K., and Engels, E. A. (2012). Long-term cancer risk among people diagnosed with AIDS during childhood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 148–154. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0823.
- Simone, O., Bejarano, M. T., Pierce, S. K., Antonaci, S., Wahlgren, M., Troye-Blomberg, M., et al. (2011). TLRs innate immunereceptors and Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) CIDR1 $\alpha$ -driven human polyclonal B-cell activation. *Acta Tropica* 119, 144–150. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.005.
- Singh, E., Naidu, G., Davies, M.-A., and Bohlius, J. (2017). HIV-associated malignancies in children. *Curr Opin HIV AIDS* 12, 77–83. doi:10.1097/COH.0000000000000331.
- Slogrove, A. L., Esser, M. M., Cotton, M. F., Speert, D. P., Kollmann, T. R., Singer, J., et al. (2017). A Prospective Cohort Study of Common Childhood Infections in South African HIV-exposed Uninfected and HIV-unexposed Infants. *Pediatr Infect Dis J* 36, e38–e44.
- Slogrove, A. L., Goetghebuer, T., Cotton, M. F., Singer, J., and Bettinger, J. A. (2016). Pattern of Infectious Morbidity in HIV-Exposed Uninfected Infants and Children. *Front Immunol* 7, 164. doi:10.3389/fimmu.2016.00164.
- Slogrove AL, Powis KM, Johnson LF, Stover J, Mahy M. Estimates of the global population of children who are HIV-exposed and uninfected, 2000-18: a modelling study. *Lancet Glob Health*. 2020 Jan;8(1):e67–e75.
- Slyker, J. A., Casper, C., Tapia, K., Richardson, B., Bunts, L., Huang, M.-L., et al. (2013). Clinical and virologic manifestations of primary Epstein-Barr virus (EBV) infection in Kenyan infants born to HIV-infected women. *J Infect Dis* 207, 1798–1806. doi:10.1093/infdis/jit093.
- Slyker, J. A., Casper, C., Tapia, K., Richardson, B., Bunts, L., Huang, M.-L., et al. (2014). Accelerated Suppression of Primary Epstein-Barr Virus Infection in HIV-Infected Infants Initiating Lopinavir/Ritonavir-Based Versus Nevirapine-Based Combination Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 58, 1333–1337. doi:10.1093/cid/ciu088.
- Snider, C. J., Cole, S. R., Chelimo, K., Sumba, P. O., Macdonald, P. D. M., John, C. C., et al. (2012). Recurrent Plasmodium falciparum malaria infections in Kenyan children

diminish T-cell immunity to Epstein Barr virus lytic but not latent antigens. *PLoS ONE* 7, e31753. doi:10.1371/journal.pone.0031753.

Snow, R. W., Nahlen, B., Palmer, A., Donnelly, C. A., Gupta, S., and Marsh, K. (1998). Risk of severe malaria among African infants: direct evidence of clinical protection during early infancy. *J Infect Dis* 177, 819–822. doi:10.1086/517818.

Soren Gantt, C. C. (2011). Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. *Current opinion in infectious diseases* 24, 295–301. doi:10.1097/QCO.0b013e3283486d04.

Springer, P. E., Slogrove, A. L., Laughton, B., Bettinger, J. A., Saunders, H. H., Molteno, C. D., et al. (2018). Neurodevelopmental outcome of HIV-exposed but uninfected infants in the Mother and Infants Health Study, Cape Town, South Africa. *Trop Med Int Health* 23, 69–78. doi:10.1111/tmi.13006.

Stevens, S. J. C., Blank, B. S. N., Smits, P. H. M., Meenhorst, P. L., and Middeldorp, J. M. (2002). High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS* 16, 993–1001.

Sugandhi, N., Rodrigues, J., Kim, M., Ahmed, S., Amzel, A., Tolle, M., et al. (2013). HIV-exposed infants: rethinking care for a lifelong condition. *AIDS* 27 Suppl 2, S187–95.

Sumaya, C. V., Myers, L. W., and Ellison, G. W. (1980). Epstein-Barr virus antibodies in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 37, 94–96. doi:10.1001/archneur.1980.00500510052009.

Sumaya, C. V., and Ench, Y. (1985). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 75, 1003–1010.

Tao, Q., Robertson, K. D., Manns, A., Hildesheim, A., and Ambinder, R. F. (1998). Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91, 1373–1381.

Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. (2003). Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma.

Ternak, G. (2003). Epstein-Barr virus reactivation. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 271. doi:10.1016/s1473-3099(03)00603-0.

Thomas, R., Macsween, K. F., McAulay, K., Clutterbuck, D., Anderson, R., Reid, S., et al. (2006). Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J Med Virol* 78, 1204–1209. doi:10.1002/jmv.20682.

Thorley-Lawson, D. A. (2015). EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 390, 151–209. doi:10.1007/978-3-319-22822-8\_8.



- Thorley-Lawson, D. A., and Gross, A. (2009). Persistence of the Epstein–Barr Virus and the Origins of Associated Lymphomas. <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJMra032015> 350, 1328–1337. doi:10.1056/NEJMra032015.
- Timms, J. M., Bell, A., Flavell, J. R., Murray, P. G., Rickinson, A. B., Traverse-Glehen, A., et al. (2003). Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *The Lancet* 361, 217–223. doi:10.1016/S0140-6736(03)12271-4.
- Travis, W. D., Fox, C. H., Devaney, K. O., Weiss, L. M., O'Leary, T. J., Ognibene, F. P., et al. (1992). Lymphoid pneumonitis in 50 adult patients infected with the human immunodeficiency virus: lymphocytic interstitial pneumonitis versus nonspecific interstitial pneumonitis. *Hum Pathol* 23, 529–541. doi:10.1016/0046-8177(92)90130-u.
- Tsao, S.-W., Tsang, C. M., To, K.-F., and Lo, K.-W. (2015). The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J. Pathol.* 235, 323–333. doi:10.1002/path.4448.
- Tuaille, E., Valea, D., Becquart, P., Tabaa, A., Meda, N., Bollore, K., et al. (2009). Human milk-derived B cells: a highly activated switched memory cell population primed to secrete antibodies. *The Journal of Immunology* 182, 7155–7162. doi:10.4049/jimmunol.0803107.
- Tzellos, S., Correia, P. B., Karstegl, C. E., Cancian, L., Cano-Flanagan, J., McClellan, M. J., et al. (2014). A single amino acid in EBNA-2 determines superior B lymphoblastoid cell line growth maintenance by Epstein-Barr virus type 1 EBNA-2. *Journal of Virology* 88, 8743–8753. doi:10.1128/JVI.01000-14.
- U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events, Version 2.0. [November 2014]. Available at: <https://rsc.niaid.nih.gov/sites/default/files/daids-ae-grading-table-v2-nov2014.pdf>. Accessed 7 May 2019.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., et al. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300–303. doi:10.1126/science.286.5438.300.
- Viljoen, J., Gampini, S., Danaviah, S., Valea, D., Pillay, S., Kania, D., et al. (2010). Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 55, 290–298. doi:10.1097/QAI.0b013e3181edaaf5.
- Viljoen, J., Tuaille, E., Nagot, N., Danaviah, S., Peries, M., Padayachee, P., et al. (2015). Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breast milk is associated with HIV-1 transmission by breastfeeding. *AIDS* 29, 145–153.

- Wang, F. (2013). Nonhuman primate models for Epstein-Barr virus infection. *Current Opinion in Virology* 3, 233–237. doi:10.1016/j.coviro.2013.03.003.
- Wang, M., Yu, F., Wu, W., Wang, Y., Ding, H., and Qian, L. (2018). Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 565–576. doi:10.7150/ijbs.24562.
- Wang, X., Yang, K., Wei, C., Huang, Y., and Zhao, D. (2010). Coinfection with EBV/CMV and other respiratory agents in children with suspected infectious mononucleosis. *Virology Journal* 2010 7:1 7, 247. doi:10.1186/1743-422X-7-247.
- Whittle, H. C., Brown, J., Marsh, K., Greenwood, B. M., Seidelin, P., Tighe, H., et al. (1984). T-cell control of Epstein–Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria. *Nature* 312, 449–450. doi:10.1038/312449a0.
- WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 70: Epstein–Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. Lyon, France. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/index.php>. 2012.
- Williams, H., Macsween, K., McAulay, K., Higgins, C., Harrison, N., Swerdlow, A., et al. (2004). Analysis of immune activation and clinical events in acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 190, 63–71. doi:10.1086/421276.
- World Health Organization (2005). Interim WHO clinical staging of HVI/AIDS and HIV/AIDS case definitions for surveillance: African Region. Available at: <https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/casedefinitions/en/> Accessed 7 May 2019.
- World Health Organization (2009). WHO: United Nations Children's Fund. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Geneva: WHO; 2009. Available at: <https://www.who.int/nutrition/publications/severemalnutrition>. Accessed 7 May 2019.
- World Health Organization. Global guidance on criteria and processes for validation: elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis, 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017. Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/25951>. Accessed 7 May 2019.
- Xiao, J., Palefsky, J. M., Herrera, R., and Tugizov, S. M. (2007). Characterization of the Epstein-Barr virus glycoprotein BMRF-2. *Virology* 359, 382–396. doi:10.1016/j.virol.2006.09.047.
- Xiong, G., Zhang, B., Huang, M.-Y., Zhou, H., Chen, L.-Z., Feng, Q.-S., et al. (2014). Epstein-Barr virus (EBV) infection in Chinese children: a retrospective study of age-specific prevalence. *PLoS ONE* 9, e99857. doi:10.1371/journal.pone.0099857.
- Yadav, M. S., Malliga, N., and Ablashi, D. V. (1987). Development of immunity to Epstein-Barr virus in Malaysian children. *Microbiologica* 10, 29–35.

- Yamanishi, K. (2007). *Koichi Yamanishi, A.A., Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, 1st ed. Cambridge University Press.*
- Yao, T.-T., Qian, J.-D., Zhu, W.-Y., Wang, Y., and Wang, G.-Q. (2020). A systematic review of lopinavir therapy for SARS coronavirus and MERS coronavirus-A possible reference for coronavirus disease-19 treatment option. *J Med Virol* 92, 556–563. doi:10.1002/jmv.25729.
- Yeka, A., Gasasira, A., Mpimbaza, A., Achan, J., Nankabirwa, J., Nsobya, S., et al. (2012). Malaria in Uganda: challenges to control on the long road to elimination: I. Epidemiology and current control efforts. *Acta Tropica* 121, 184–195. doi:10.1016/j.actatropica.2011.03.004.
- Yone, C. L. R. P., Kube, D., Kremsner, P. G., and Luty, A. J. F. (2006). Persistent Epstein-Barr viral reactivation in young African children with a history of severe Plasmodium falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 669–676. doi:10.1016/j.trstmh.2005.08.009.
- Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4, 757–768. doi:10.1038/nrc1452.
- Young, L. S., Yao, Q. Y., Rooney, C. M., Sculley, T. B., Moss, D. J., Rupani, H., et al. (1987). New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* 68 ( Pt 11), 2853–2862. doi:10.1099/0022-1317-68-11-2853.
- Zhang, T., Fu, Q., Gao, D., Ge, L., Sun, L., and Zhai, Q. (2014). EBV associated lymphomas in 2008 WHO classification. *Pathol Res Pract* 210, 69–73. doi:10.1016/j.prp.2013.11.009.
- Ziegler, J. L., Drew, W. L., Miner, R. C., Mintz, L., Rosenbaum, E., Gershow, J., et al. (1982). Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *The Lancet* 2, 631–633. doi:10.1016/s0140-6736(82)92740-4.

## **XI. TABLAS**

Tabla 1. Hitos históricos en la investigación del Virus de Epstein-Barr .....	21
Tabla 2. Programas genéticos utilizados por el VEB en su célula huésped (tumoral o no tumoral). Esta tabla esta adaptada de la referencia Thorley-Lawson, 2015 y Cohen 2000 .....	24
Tabla 3. Funciones de algunas de las proteínas del VEB .....	28
Tabla 4. Patología asociada con el VEB. Tabla tomada de la referencia Thorley-Lawson 2004. ....	40
Tabla 5. Principales tumores asociados con el VEB. Tabla adaptada de la referencia Shannon-Lowe and Rickinson 2019 .....	43
Tabla 6. Patología benigna y maligna asociada al VEB en pacientes VVI.....	50
Tabla 7. Características basales socio-demográficas, clínicas e inmunoviológicas de las 201 parejas madres-niños.....	86
Tabla 8. Análisis univariado y multivariado de los factores asociados a la presencia del ADN del VEB en leche materna a la semana 1 postparto .....	92
Tabla 9. Eventos adversos graves entre los niños infectados y no infectados por el VEB..	95
Tabla 10. Análisis univariado y multivariado de los factores asociados a la infección por el VEB en los niños HEU a la semana 50 de vida.....	97
Tabla 11. Factores asociados con una alteración en el P/L a la semana 50 (análisis univariado y multivariado).....	105
Tabla 12. Prevalencia de la infección por el VEB según área geográfica, exposición a la infección VIH o malaria u origen étnico .....	119

## XII. FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura del VEB y moléculas que intervienen en la interacción virus-célula huésped. Adaptada de Draborg et al., 2013.....	22
Figura 2. Representación esquemática del genoma del VEB y principales proteínas latentes. Figura adaptada de Young and Rickinson, 2004 .....	25
Figura 3. Etapas de maduración del linfocito B en el centro germinal. ....	29
Figura 4. Infección crónica del VEB propuesta por la teoría del centro germinal. ....	31
Figura 5. Patrón serológico de la infección por el VEB. Distinción entre infección aguda (reactivación) y crónica. Fuente: <a href="https://virology-online.com/viruses/ebvantibody.jpg">https://virology-online.com/viruses/ebvantibody.jpg</a> .....	34
Figura 6. Representación de la interacción entre el VEB y el Plasmodium falciparum (Pf) en la génesis del Linfoma Burkitt endémico. Figura adaptada de la referencia Molyneux et al., 2012 .....	45
Figura 7. Modelo de la patogénesis del Linfoma Hodgkin clásico en los pacientes infectados por el VIH. Figura tomada de la referencia Dolcetti et al., 2016.....	53
Figura 8. Hospital de Mbale. Cortesía del equipo ANRS 12174.....	69
Figura 9. Representación del grado de endemidad de malaria en Uganda. Imagen tomada de la referencia Yeka et al., 2012. ....	72
Figura 10. Materiales y métodos empleados durante el estudio.....	74
Figura 11. Validación de la cuantificación de los niveles de anticuerpos IgG anti-VCA en muestras DBS.....	77
Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de selección de las parejas madres-niños e identificación de los niños infectados por el VEB .....	84
Figura 13. Incidencia acumulada de la infección por el VEB según una curva Kaplan-Meier .....	87
Figura 14. Representación en barras del porcentaje de madres con muestras positivas en ADN del VEB en plasma según la presencia (Leche + VEB) o no (Leche – VEB) de ADN del VEB en la leche.....	89
Figura 15. Correlación entre los niveles de ADN del VEB en leche y plasma maternos ....	89
Figura 16. Representación en barras del porcentaje de madres con muestras positivas en ARN del VIH en plasma según la presencia (Leche + VEB) o no (Leche – VEB) de ADN del VEB en la leche.....	90
Figura 17. Recuento materno de linfocitos CD4 según la presencia o no de ADN del VEB en muestras de leche.....	90
Figura 18. Estimación de la caída de anticuerpos maternos a lo largo del primer año de vida .....	93
Figura 19. Diferencias en lo niveles de anticuerpos IgG anti-VCA a la semana 1 postparto entre los niños infectados precozmente (antes o a la semana 14), después de la semana 14 o no infectados por el VEB a la semana 50.....	98
Figura 20. Niveles de ADN del VEB según la ocurrencia de eventos adversos graves (EAG) .....	100
Figura 21. Niveles de ADN del VEB según la edad de adquisición del VEB.....	103
Figura 22. Niveles de ADN del VEB según la profilaxis antiretroviral recibida .....	103

### XIII. ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AID	Activation <i>Induced</i> Cytosine Deaminase
ARN	Acido ribonucleico
ARV	Antirretroviral
BART	Bam A Rightward Transcripts
BCL-2	B cell lymphoma 2
BCR	B cell receptor
DBS	Dried Blood Spot
DDR1	Discoidin domain receptor 1
DS	Desviación standard
EA-R	Early antigen
EAG	Eventos adversos graves
EBERs	EBV-encoded RNAs
EBNA-LP	Leader protein of nuclear antigen
EBNA	Nuclear antigen del VEB
HEI	HIV exposed infected
HEU	HIV exposed uninfected
HHV-8	herpes virus humano 8
HUU	HIV unexposed uninfected
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
INF- $\gamma$	Interferón gamma
LB	Linfoma Burkitt
LBe	Linfoma Burkitt endémico
LDCGB	linfoma difuso de células B grandes
LH	Linfoma Hodgkin
LMP	Latent membrane protein
LNH	Linfomas no hodgkinianos
LPSNC	Linfoma primario del sistema nervioso central
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
MALT	Mucosal-associated lymphoid tissue
P.falciparum	Plasmodium falciparum
P.vivax	Plasmodium vivax
PVV	Personas que viven con VIH
RIQ	Rango intercuartílico
RS	Reed–Sternberg
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor

VCA	Viral capsid antigen
VEB	Virus de Epstein-Barr
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## XIV. APÉNDICES



# Clinical and Biological Factors Associated With Early Epstein-Barr Virus Infection in Human Immunodeficiency Virus–Exposed Uninfected Infants in Eastern Uganda

Ana Montoya-Ferrer,<sup>1</sup> Armen Sanosyan,<sup>1</sup> Alexis Fayd'herbe de Maudave,<sup>1</sup> Amandine Pisoni,<sup>1</sup> Karine Bollere,<sup>1</sup> Jean-Pierre Molès,<sup>1</sup> Marianne Peries,<sup>1</sup> Thorkild Tylleskar,<sup>2</sup> James K. Tumwine,<sup>3</sup> Grace Ndeezi,<sup>3</sup> Miguel Gorgolas,<sup>4</sup> Nicolas Nagot,<sup>1</sup> Philippe van de Perre,<sup>1</sup> and Edouard Tuillon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Etablissement Français du Sang, University of Montpellier, Montpellier University Hospital CHU, Montpellier, Montpellier, France, <sup>2</sup>Center for International Health, University of Bergen, Bergen, Norway, <sup>3</sup>Department of Pediatrics and Child Health, School of Medicine, College of Health Sciences, Makerere University, Kampala, Uganda, and <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, Hospital Fundación Jiménez-Díaz, University Autónoma, Madrid, Spain

**Background.** Immune control of Epstein-Barr virus (EBV) infection is impaired in individuals with HIV. We explored maternal factors associated with EBV acquisition in HIV-exposed uninfected (HEU) infants and the relationship between EBV infection and serious adverse events (SAEs) during the first year of life.

**Methods.** 201 HEU infants from Uganda enrolled in the ANRS 12174 trial were tested for antiviral capsid antigen (anti-VCA) antibodies at week 50. Date of infection was estimated by testing EBV DNA at weeks 1, 6, 14, 26, 38, and 50 postpartum on dried blood spots.

**Results.** Eighty-seven (43%) infants tested positive for anti-VCA IgG at week 50. Among the 59 infants positive for EBV DNA, 25% were infected within the first 26 weeks. Almost half (12%) were infected before week 14. Shedding of EBV in breast milk was associated with EBV DNA in maternal plasma ( $P = .009$ ), HIV RNA detection ( $P = .039$ ), and lower CD4 count ( $P = .001$ ) and correlated with plasma EBV DNA levels ( $P = .002$ ). EBV infant infection at week 50 was associated with shedding of EBV in breast milk ( $P = .009$ ) and young maternal age ( $P = .029$ ). Occurrence of a clinical SAE, including malaria and pneumonia, was associated with higher levels of EBV DNA in infants ( $P = .010$ ).

**Conclusions.** By assessing EBV infection in HEU infants we observed that infection during the first year is determined by HIV and EBV maternal factors and that EBV DNA levels were higher among infants with clinical SAEs.

**Keywords.** EBV; primary infection; HIV-exposed uninfected infants; Africa; herpes viruses.

The population of human immunodeficiency virus (HIV)–exposed uninfected (HEU) infants is growing steadily due to effective prevention programs of mother-to-child transmission (MTCT) [1]. However, several studies suggest that HEU infants have increased morbidity and mortality of infectious origin [2], and reports about growth and neurodevelopment are still concerning [3–5].

Epstein-Barr virus (EBV) infection commonly occurs during early childhood in Africa, and nearly half of infants from Western and Eastern countries have acquired the infection by 1 year of age [6, 7]. More recent studies conducted in Eastern African countries have reported similar rates of EBV infection among HEU infants at 1 year of life [8, 9].

Biological factors associated with early EBV infection remain to be explored in HEU infants. Immunosuppression and overactivation of lymphocytes impair the host control over EBV infection in subjects with HIV [10, 11]. Epstein-Barr virus is essentially transmitted by saliva [12], and EBV oral shedding is increased in mothers with HIV [9]. Although breastfeeding is not considered a risk factor for EBV transmission [9, 13, 14], the infectious potential of EBV in breast milk has been recently suggested [15]. Furthermore, the presence of EBV in breast milk may enhance MTCT of HIV [16]. HEU infants might also be more vulnerable to EBV infection due to impaired transplacental transfer of protective maternal antibodies [17, 18].

Primary EBV infection is usually asymptomatic when it occurs during early age [19, 20]. However, early EBV infection has been suggested as a risk factor for EBV-related malignancies, such as the endemic Burkitt lymphoma (eBL), the most prevalent pediatric cancer in Africa [6–8, 21]. Geographic distribution of eBL is overlapped with high-endemic malaria regions, highlighting the role of malaria and EBV interactions in eBL genesis [22]. In this study, we aimed to determine the onset of EBV infection in HEU infants during the first year of life in

Received 15 October 2019; editorial decision 6 February 2020; accepted 13 February 2020; published online February 18, 2020.

Correspondence: A. Montoya-Ferrer, Department of Infectious and Tropical Diseases, CHU de Montpellier—Hôpital Gui de Chauliac, 80 av Augustin Fliche, 34295 Montpellier Cedex 5, France (a-montoyaferrer@chu-montpellier.fr).

Clinical Infectious Diseases® 2020;XX(X):1–7

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/ciaa161

Africa and maternal factors associated with early EBV infection. We also assessed the relationship between EBV infection, growth and serious adverse events (SAEs) recorded during the follow-up period.

## METHODS

### Study Population and Samples

This longitudinal study included infants born to mothers with HIV enrolled in the ANRS 12174 trial (NCT00640263). The ANRS 12174 trial is a randomized, multicenter, controlled trial held in Burkina Faso, South Africa, Uganda, and Zambia from 2009 to 2012 [23]. HEU breastfed infants born to mothers with HIV who were not eligible for antiretroviral (ARV) therapy (CD4 count >350 cells/ $\mu$ L) according to national and international guidelines at that time were randomized to either lopinavir–ritonavir or lamivudine infant prophylaxis to prevent postnatal MTCT of HIV up to 50 weeks of breastfeeding.

The study population was enrolled at Mbale Regional Referral Hospital, a semirural site in Eastern Uganda. Infants and maternal samples were stored locally at  $-80^{\circ}\text{C}$  and then sent to INSERM UMR-1058 Montpellier research unit. Plasma HIV RNA was tested using the Generic HIV Charge Virale assay (Biocentric), as previously described [24]. The lower limit of detection was 300 copies/mL.

### Diagnoses of Epstein-Barr Virus Infection in Mothers and HEU Infants

Epstein-Barr virus infection was diagnosed by detecting immunoglobulin G (IgG) antibodies directed against viral capsid antigen (VCA) in 201 maternal plasma and dried blood spot (DBS) samples collected in infants at week 1 and week 50, respectively, using an automated immunoassay according to the manufacturer's instructions (Liaison VCA IgG; DiaSorin). Results were expressed as signal to cutoff index (sample signal relative light units [RLU]/mean levels of anti-VCA negative controls + 3 standard deviations). The technique was validated in DBS samples (Supplementary Figure 1).

The index of maternally transferred anti-VCA IgG antibodies was only tested in a subgroup of 150 infants at week 1. The decay of the index after birth is shown in Supplementary Figure 2.

### Epstein-Barr Virus DNA Quantification

Dried blood spot samples from 87 infants detected positive for anti-VCA IgG at week 50 were sequentially tested for EBV DNA in all sampling points of the follow-up (weeks 1, 6, 14, 26, 38, and 50).

A DBS disc of 6 mm was punched into 1.5-mL sample tubes. Nucleic acid elution was performed in 200  $\mu$ L according to the method previously described [25]. Epstein-Barr virus DNA was also tested in 188 lactoserum and 197 maternal plasma samples at week 1 postpartum.

Epstein-Barr virus DNA was extracted using an automated QIAamp DNA Mini QIAcube kit according to the

manufacturer's protocol (Qiagen) and EBV DNA was amplified using the R-gene EBV kit (Argene; Biomerieux). The results were expressed as EBV DNA copies/ $10^6$  cells in DBS samples and as copies/mL in plasma and breast-milk samples. Human cell count in the DBSs was determined using  $\beta$ -globin quantitative polymerase chain reaction as described [26]. The detection limit of the R-gene EBV kit was set at 182 copies/mL according to the manufacturer [27].

The highest level of EBV DNA quantified in DBSs during the follow-up was considered as the peak of EBV DNA.

### Malaria Exposure

Asymptomatic malaria was assessed by detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* DNA, which is considered an appropriate method to estimate malaria prevalence in low-transmission settings [28]. DNA was eluted and extracted from DBS samples in 177 and 197 infants at weeks 26 and 50, respectively (as described above). Detection of *P. falciparum* and *P. vivax* DNA was done by a nested polymerase chain reaction [29].

### Clinical Assessments

Grade III or IV SAEs of were recorded at any time between week 1 and 50 [23, 30]. We distinguished SAEs as biological—abnormal laboratory blood test (eg, anemia)—or as clinical (eg, pneumonia) (see Supplementary Table 1). Malaria infection was considered as a clinical SAE based on clinical symptoms and thick blood smear independently of detection of *P. falciparum* DNA on DBS samples at week 26 or 50.

Growth at 1 year of age was evaluated as weight-for-length (WLZ), weight-for-age (WAZ), and length-for-age (LAZ)  $z$  scores using the World Health Organization (WHO) child growth standards and the free WHO program (<http://www.who.int/childgrowth/training/en/>) [31]. Growth was assessed among 158 infants who had completed the final visit. WLZ, WAZ, and LAZ were considered severely to moderately abnormal when the  $z$  score was less than  $-2$ .

### Statistical Analysis

The cumulative incidence of primary EBV infection was calculated using the Kaplan–Meier method. Characteristics were compared between EBV-infected and EBV-uninfected infants at week 50 using the  $\chi^2$  test for categorical variables or Fisher's exact test if the numbers were small. Continuous data were assessed with Student's  $t$  test or Wilcoxon Mann–Whitney test when their distributions were nonnormal. Spearman's rank correlation coefficient was used to describe the correlation between maternal EBV DNA levels in plasma and breast milk. Epstein-Barr virus DNA and HIV RNA levels were log-transformed and undetectable viral loads were transformed to logarithmic zero for analyses. All tests were 2-tailed with  $\alpha = .05$ .

A logistic regression model with a backward selection was used to identify maternal and infant risk factors associated with

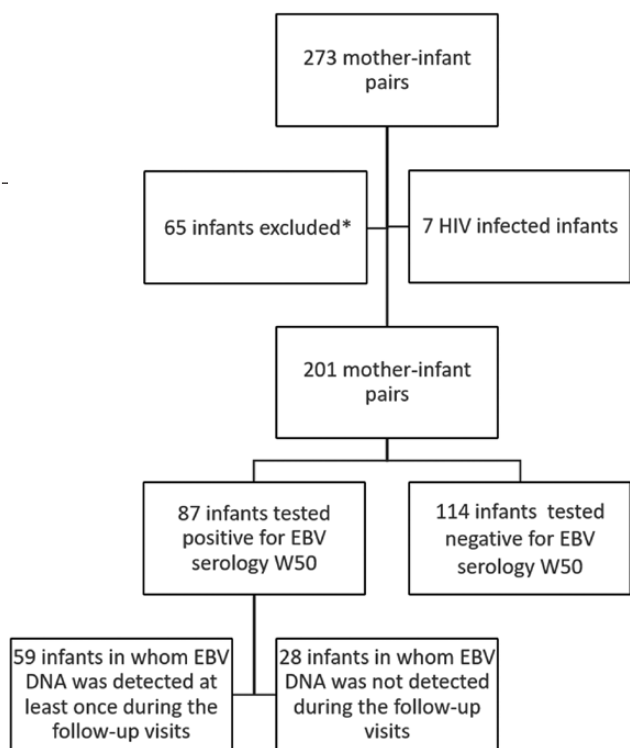
EBV infection at week 50 and to estimate the risk factors of a WLZ score less than  $-2$  SDs in infants at 1 year of life. Variables with a  $P$  value less than .20 in univariate analysis were included in the multivariate model. The prophylactic ARV regimen was also included in the multivariate model since a prophylactic regimen based on lopinavir-ritonavir might impair growth in HEU infants [4].

Statistical analyses and graphs were performed using IBM SPSS Statistics 20 software (SPSS, Inc) and GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc).

## RESULTS

### Baseline Characteristics of Study Population

Out of 273 mother–infant pairs enrolled in the ANRS 12174 trial in the Ugandan study site, 201 were selected for the present substudy since they had completed the follow-up visits and had available baseline specimens (Figure 1). Baseline sociodemographic and biological characteristics were not significantly different between mother–infant pairs included and not included (data not shown). The majority of mothers included presented with WHO clinical HIV-1 stage I [32] and a median of CD4 values above 500 cells/ $\mu$ L. One-third of mothers had detectable levels of HIV RNA in plasma. The median breastfeeding duration was 40 weeks (Table 1). All mothers were anti-VCA IgG positive.



**Figure 1.** Diagram of study procedures. Flowchart summarizing the identification of EBV-infected infants. \*Follow-up visits missing or samples not available. Abbreviations: EBV, Epstein-Barr virus; HIV, human immunodeficiency virus.

### Dynamics of Epstein-Barr Virus Infection in HEU Infants

Anti-VCA IgG antibodies were detected in 87 out of 201 infants (43%) at week 50 of life. Among them, a median of 6 DBS samples per infant (interquartile range [IQR], 4–6) were retrospectively tested for EBV DNA. Epstein-Barr virus DNA was detected at least once in 59 infants (68%): 7 out of 59 (12%) at weeks 6 and 14, 8 (14%) at week 26, and 34 (58%) at weeks 38 and 50 (Supplementary Figure 3). No sample was detected to be positive for EBV DNA at week 1 postpartum. The median values and IQR of the peak of EBV DNA was 713 copies/ $10^6$  cells (261–2739/ $10^6$  cells).

### Factors Associated With Epstein-Barr Virus Infant Infection During the First Year of Life

#### Maternal Factors

Epstein-Barr virus infection at week 50 was associated with young maternal age ( $P = .029$ ) and detectable levels of HIV RNA in plasma ( $P = .035$ ) (Table 2). Educational level, maternal parity, and breastfeeding duration were not associated with EBV infection at week 50 in univariate analysis (Table 2).

Breast-milk and plasma EBV DNA was detectable in 19% (35/188) and 8% (15/197) of mothers at week 1 postdelivery,

**Table 1.** Baseline Sociodemographic, Clinical, and Immunovirological Characteristics of 201 Mother–Infant Pairs

	Values
<b>Maternal characteristics</b>	
Age (years), n (%)	
18–22	50 (24.9)
23–26	54 (26.9)
27–30	63 (31.3)
31–40	34 (16.9)
Educational level completed, n (%)	
None	11 (5.5)
Primary	125 (62.2)
Secondary or tertiary	65 (32.3)
Parity, n	3 (2–5)
PMTCT regimen, n (%)	
During pregnancy	166 (82.6)
During labor	200 (99.5)
WHO clinical HIV-1 staging, n (%)	
Staging I	182 (90.5)
Staging II, III	19 (9.5)
CD4 cell count, <sup>a</sup> cells/ $\mu$ L	525 (436–624)
Detectable plasma HIV-1 RNA (>300 copies/mL), <sup>a</sup> n (%)	68 (33.8) [200]
Breastfeeding duration, weeks	40.4 (36.3–43)
<b>Infant characteristics</b>	
Gestational age, weeks	40 (39–40) [200]
Birth weight, kg	3 (2.8–3.3)
Male sex, n (%)	102 (50.7)

Data are no. (%) of subjects or median values (interquartile range). N = 201. For variables with missing data, the number of participants with available data is shown in square brackets.

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; PMTCT, prevention of mother-to-child transmission; WHO, World Health Organization.

<sup>a</sup>At week 1 postpartum.

**Table 2. Maternal and Infant Factors Associated With Epstein-Barr Virus Infant Infection at Week 50 (Univariate and Multivariate Analysis)**

	Median (IQR) or n (%)		Crude Estimates <sup>a</sup>			Adjusted Estimates <sup>b</sup>		
	EBV Infected (n = 87)	EBV Uninfected (n = 114)	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
<b>Maternal factors</b>								
Age (years), n (%)								
18–22	29 (33.3)	21 (18.4)	0.73	.56–.97	.029	0.69	.51–.93	.014
23–26	22 (28.1)	32 (25.3)						
27–30	24 (34.2)	39 (29.6)						
31–40	12 (13.8)	22 (19.3)						
Educational level (primary vs secondary or more), n (%)	57 (65.5)	68 (59.6)	0.75	.41–1.36	.341			
Parity, n	3 (2–5)	3 (2–5)	0.97	.84–1.12	.668			
WHO clinical HIV-1 staging (stage I vs II/III), n (%)	76 (87.4)	106 (93)	1.92	.74–4.99	.182			
CD4 cell count, <sup>c</sup> cells/μL	521 (438–627)	529 (430–627)	1.00	.99–1.00	.535			
Detectable plasma HIV-1 RNA, <sup>c</sup> n (%)	37 (42.5)	31 (27.4) [113]	1.96	1.08–3.54	.026			
Detectable plasma EBV DNA, <sup>c</sup> n (%)	10 (11.9) [84]	5 (4.4) [113]	2.92	.96–8.89	.059			
Detectable breast-milk EBV DNA, <sup>c</sup> n (%)	22 (27.5) [80]	13 (12) [108]	2.77	1.30–5.92	.009	2.66	1.23–5.77	.013
<b>Infant factors</b>								
Gestational age, weeks	40 (39–41)	40 (39–41)	1.00	.79–1.26	.985			
Anti-VCA IgG index <sup>c</sup>	7.31 (5.79–11.68) [61]	9.09 (5.43 – 18.60) [89]	0.99	.98–1.02	.880			
<i>Plasmodium falciparum/vivax</i> DNA at week 26/50 (at least once positive vs no), n (%)	16 (14.1)	16 (18.4)	1.38	.65–2.94	.404			
SAEs during the first year of life (at least once vs no), n (%)	48 (55.17)	59 (51.75)	1.15	.65–2.01	.630			
Type of prophylaxis (lopinavir-ritonavir vs lamivudine), n (%)	50 (57.5)	58 (50.9)	1.30	.74–2.29	.353			

For variables with missing data, the number of participants with available data is shown in square brackets.

Abbreviations: CI, confidence interval; EBV, Epstein-Barr virus; HIV, human immunodeficiency virus; IgG, immunoglobulin G; IQR, interquartile range; OR, odds ratio; SAE, serious adverse event; VCA, viral capsid antigen; WHO, World Health Organization.

<sup>a</sup>Crude ORs using univariate analysis.

<sup>b</sup>Adjusted ORs using a logistic regression model with a backward selection (variables with a *P* value < .20 in univariate analysis were included in the multivariate model).

<sup>c</sup>At week 1 postpartum.

respectively. Epstein-Barr virus infection at week 50 was more frequent among infants born to mothers who tested positive for EBV DNA in breast milk (22/80; 27.5%) compared with those born to mothers who tested negative in breast milk (13/108; 12%) (*P* = .009) (Table 2). Epstein-Barr virus infection at week 50 also tended to be more frequent among infants born to mothers with detectable EBV DNA plasma samples compared with those with undetectable EBV DNA (10/84 [11.9%] vs 5/113 [4.4%]; *P* = .059) (Table 2).

#### Infant Factors

All infants had detectable anti-VCA IgG antibodies at week 1 of life without differences in anti-VCA IgG index between EBV-infected and -uninfected infants at week 50 (Table 2). Infants who acquired EBV infection before or at week 14 tended to have a lower index of anti-VCA IgG at week 1 than infants infected beyond week 14 (*P* = .153) and uninfected infants (*P* = .119) (see Supplementary Figure 4). *Plasmodium falciparum* DNA was detected in 12 out of 177 infants (6.8%) at week 26 and in 21 out of 197 (10.9%) at week 50. Only 1 infant out of 177 tested positive for *P. vivax* DNA at week 26 and 2 infants out of 197 tested positive for *P. vivax* DNA at week 50. The frequency of EBV infection at week 50 was not associated with *Plasmodium* DNA detection or with occurrence of

SAEs during the first year of life (Table 2). The univariate analysis did not demonstrate any difference in EBV infection at week 50 between the 2 prophylactic ARV regimens (Table 2).

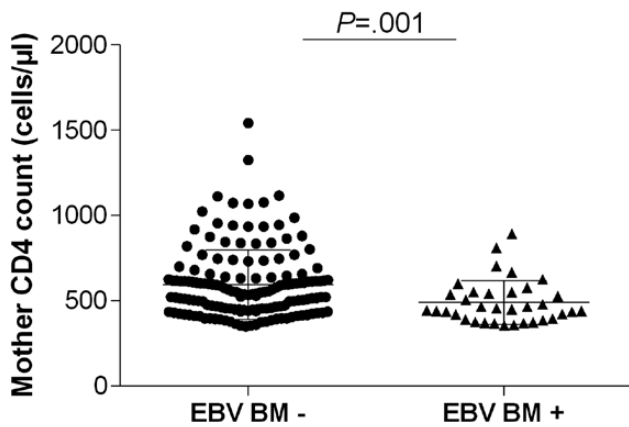
#### Risk Factors for Epstein-Barr Virus Infection During the First Year of Life

Epstein-Barr virus DNA shedding in breast milk at week 1 and young maternal age remained significantly associated with EBV infection at week 50 in multivariate analysis (Table 2).

#### Factors Associated With the Presence of Epstein-Barr Virus DNA in Breast Milk at Week 1

Seven out of 35 (20%) mothers who tested positive for EBV DNA in breast milk also tested positive for EBV DNA in plasma compared with only 8 out of 152 (5.3%) mothers who tested negative for EBV DNA in breast milk but positive in plasma (*P* = .009; data not shown). When detected, EBV DNA levels were higher in breast milk than in maternal plasma samples (ranging from 75 to 34,200 copies/mL compared with 2 to 342 copies/mL, respectively) and were correlated in both compartments ( $\rho$  = 0.228, *P* = .002) (data not shown). Epstein-Barr virus DNA in breast milk was more frequently detected among mothers with detectable plasma HIV RNA compared with mothers who tested negative for plasma HIV RNA (48.6%



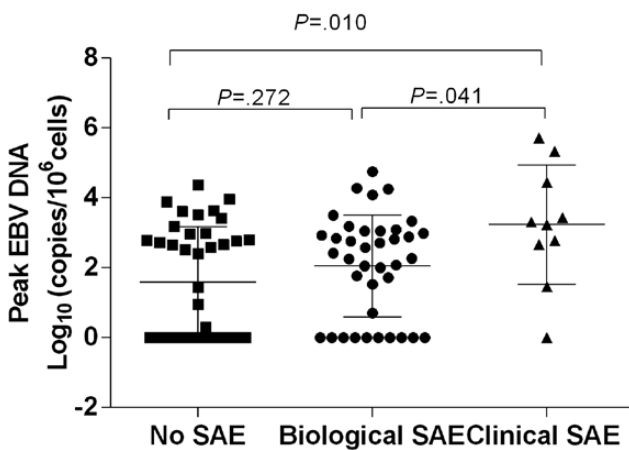


**Figure 2.** Number of CD4 T cells according to EBV shedding in BM. Middle lines and end bars represent means and standard deviations of maternal CD4 T-cell count. Differences between groups were analyzed using the Mann–Whitney test. Abbreviations: BM, breast milk; EBV, Epstein-Barr virus.

vs 30.3%;  $P = .039$ ) (data not shown). The presence of EBV in breast milk was also significantly associated with a lower median (IQR) CD4 cell count (451 cells/ $\mu\text{L}$  [391–550] vs 549 cells/ $\mu\text{L}$  [451–638];  $P = .001$ ) (Figure 2). Levels of EBV DNA in plasma were not correlated with plasma HIV RNA.

#### Factors Associated With Higher Epstein-Barr Virus Viral Load in Infants

Among the 10 EBV-infected infants diagnosed with a clinical SAE, half of them experienced an episode of malaria. The peak of EBV DNA was higher among infants who presented a clinical SAE during follow-up compared with those without an SAE (median, 1887 copies/ $10^6$  cells [IQR, 362–76 138] vs 27



**Figure 3.** Levels of EBV DNA in EBV-infected infants according to occurrence of SAEs. The peaks of EBV DNA (as the highest level of EBV DNA recorded over the study period) were compared between infants having not experienced biological (abnormal laboratory blood test; eg, anemia) or clinical SAEs ( $n = 39$ ) and having experienced biological ( $n = 38$ ) or clinical (eg, pneumonia) ( $n = 10$ ) SAEs. Middle lines and end bars represent means and standard deviations of EBV DNA levels compared by the Mann–Whitney test. Abbreviations: EBV, Epstein-Barr virus; SAE, serious adverse event.

copies/ $10^6$  cells [IQR, 0–920];  $P = .010$ ) (Figure 3). The peak of EBV DNA was detected after the occurrence of the clinical SAE in 8 out of 10 infants. In 3 out of 4 infants for whom a diagnosis of malaria was made, EBV DNA was detected in the week following the probable malaria episode (data not shown).

A higher peak of EBV DNA was not associated with the presence of *P. falciparum* or *P. vivax* DNA in infants' DBSs at weeks 26 or 50 or with the prophylactic ARV regimen (lopinavir-ritonavir vs lamivudine) (data not shown).

#### Association Between Epstein-Barr Virus Infection and Infant Anthropometric Status

A severe–moderate WLZ ( $z$  score less than  $-2$ ) at week 50 was more frequently found among EBV-infected infants compared with uninfected infants: 10 of 15 (66.7%) versus 5 of 15 (33.3%) ( $P = .024$ ) (Table 3). A lower gestational age and the occurrence of at least 1 SAE during the follow-up period were also associated with a WLZ less than  $-2$  at week 50 (Table 3). In multivariate analysis, EBV infection at week 50 remained associated with a WLZ less than  $-2$ , independently of gestational age or the occurrence of an SAE during follow-up (Table 3).

No differences in WAZ and LAZ at week 50 were found between EBV-infected and uninfected infants (data not shown).

#### DISCUSSION

Our results suggest that the shedding of EBV in maternal breast milk can be considered as a marker of immunosuppression in mothers with HIV. Together with the transfer of less-protective maternal antibodies this may facilitate EBV infection in infants. Furthermore, serious clinical conditions including malaria and pneumonia were associated with higher EBV DNA levels.

In this cohort, almost half of the HEU infants acquired EBV infection during the first year of life. Previous studies from Kenya and also Uganda have shown comparable rates ranging from 40% to 47% at 1 year of life [8, 9]. Of note, primary EBV infection at 1 year was found in a similar percentage before the start of the HIV epidemic among African infants from urban Ghana and Uganda [6, 7]. Early age at EBV acquisition has been described among non-Hispanic black children in the United States [14]. According to the authors, genetics and family environmental factors might be associated with the acquisition of EBV infection [14].

We detected EBV infection within the first 26 weeks in at least one-quarter of HEU infants, and in some of them before week 14. As previously suggested, transfer of less-protective maternal antibodies may be responsible for EBV infection before 6 months among HIV-exposed infants (HIV-exposed infected-HEI and HEU) [8, 9, 33, 34] or infants living in high-malaria-endemic regions [21, 35]. Epstein-Barr virus infection has been diagnosed as early as 6 weeks of life in 13% (33 out of 257) of HEI infants participating in a Zimbabwean study, with a rate of 2% of congenital EBV infection [33], while it reached 14% of HEI in the first trimester of life in a Kenyan study [34].

**Table 3. Factors Associated With Infants' Abnormal Weight-for-Length z Score at Week 50 (Univariate and Multivariate Analysis)**

	WLZ		Crude Estimates <sup>a</sup>			Adjusted Estimates <sup>b</sup>		
	> -2 SDs (n = 15)	< -2 SDs (n = 143)	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age, years	27 (20–34)	26 (19–33)	1.00	.91–1.11	.959			
CD4 cell count, <sup>c</sup> cells/μL	523 (330–716)	538 (359–717)	1.00	.99–1.00	.453			
Detectable plasma HIV-1 RNA, <sup>c</sup> n (%)	7 (46.7)	47 (33.1)	0.56	.19–1.65	.293			
Birth weight, kg	2.9 (2.8–3.2)	3 (2.8–3.3)	0.99	.99–1.00	.361			
Gestational age, weeks	39 (38–40)	40 (39–40)	0.57	.38–.86	.008	0.54	.33–.89	.007
Breastfeeding duration, weeks	39.86 (33.14–44.86)	40.57 (36.43–43)	1.02	.95–1.11	.554			
Antiretroviral prophylactic regimen (lopinavir-ritonavir vs lamivudine), n (%)	8 (53.3)	68 (47.6)	1.26	.43–3.66	.670			
EBV infection by week 50 (yes vs no), n (%)	10 (66.7)	50 (35)	3.72	1.20–11.48	.022	5.27	1.47–18.94	.011
At least 1 SAE <sup>d</sup> during the first year of life (yes vs no), n (%)	13 (86.7)	76 (53.1)	5.73	1.25–26.32	.025	5.11	1.06–24.75	.043

Abbreviations: CI, confidence interval; EBV, Epstein-Barr virus; HIV, human immunodeficiency virus; OR, odds ratio; SD, standard deviation; SAE, serious adverse event; WLZ, weight-for-length z score.

<sup>a</sup>Crude ORs using univariate analysis.

<sup>b</sup>Adjusted ORs using a logistic regression model with a backward selection (prophylactic antiretroviral regimen and variables with a P value less than .20 in univariate analysis were included in the multivariate model).

<sup>c</sup>At week 1.

<sup>d</sup>All SAEs grade III or IV (including clinical and biological).

In this study, infants born to mothers with EBV shedding in breast milk were more frequently infected by EBV during the first year of life. Epstein-Barr virus DNA is encapsidated in the breast milk [36]—in contrast with EBV DNA released from lysed infected cells—and therefore consists of potentially infectious virus particles. Infectivity of EBV has been recently reported in vitro using breast-milk samples from lactating women living in a malaria-endemic region [15]. However, previous studies had not identified breast milk as a potential infectious vehicle for EBV [9, 16, 37]. Actually, our results do not demonstrate that breast milk is a route for EBV transmission but rather that EBV shedding in breast milk reflects host–virus interplay in mucosa-associated tissues, such as lactating mammary glands. Epstein-Barr virus shedding is frequent in breast milk, probably fueled by EBV replication in infected B cells, and ultimately limited by the immune response [36]. In contrast, the presence of EBV DNA in plasma is very infrequent, and when detected, this implies primary infection or an impairment of the immunosurveillance against EBV [38]. Infants participating in the ANRS 12174 trial were randomized to receive either lopinavir-ritonavir or lamivudine ARV prophylaxis. Previously, Slyker et al [34] found that HEI infants with primary EBV infection suppressed EBV replication faster when they were treated with lopinavir-based ARV treatment compared with infants treated with nevirapine. However, we did not observe a lower incidence of EBV infection, or a lower level of the EBV DNA in the infant group receiving protease inhibitor compared with the lamivudine group.

We observed a relationship between the occurrence of clinical SAEs, including malaria, and the peak of EBV DNA, which was generally detected after the occurrence of clinical SAEs.

Symptomatic primary EBV infection can occur in both healthy infants [39] and infants born to mothers with HIV [8, 33]. In a previous study, mild clinical symptoms in HEU infants—and more severe symptoms in HEI infants—were concomitantly observed with peaks of EBV viral load, leading the authors to suggest that EBV infection may be an important cause of morbidity [8]. However, serious clinical conditions as well as stress can favor EBV reactivations [40]. Clinical SAEs are likely to be important enough to disrupt immune responses against EBV, allowing for higher viral loads.

Malaria exposure alone, however, as measured by *Plasmodium* DNA detection, was not related to EBV seroconversion at 1 year of life nor to higher EBV DNA levels. Infants living in high-malaria-endemic regions acquire EBV earlier and present higher levels of EBV DNA, as compared with infants from low-endemic areas [21].

Finally, we observed that abnormal growth at 1 year was more prevalent among infants who acquired EBV infection during first year of life, independently of gestational age and presence of an SAE. Mild growth impairment related to EBV infection has been reported in a cohort of HEI infants who were infected early with EBV [33]. Our results suggest that EBV infection may be one of the multiple infectious agents associated with early HEU morbidity and growth retardation. To our knowledge, no association between EBV infection and infant growth has been reported before the start of the HIV epidemic.

In conclusion, EBV infection in HEU infants was determined by maternal factors associated with EBV immunological control. Shedding of EBV in breast milk likely reflected impaired EBV control in mucosal compartments and the risk of EBV infection in

infants. Higher levels of EBV DNA in infants was associated with SAEs, and both EBV infection and SAEs might negatively affect infant growth. Epstein-Barr virus infection should be considered in further studies exploring the health outcomes of HEU children.

### Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

### Notes

**Acknowledgments.** The authors thank all the mothers who agreed to be part of the trial together with their infants. The authors also acknowledge the staff of the different National Agency for AIDS Research 12174 sites for their dedicated effort in this research. The authors especially thank the University of Minnesota Rochester 1058, Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Montpellier, France, from which they received great support to accomplish this work.

**Potential conflicts of interest.** The authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

### References

- World Health Organization. Global guidance on criteria and processes for validation: elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis, 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017. Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/25951>. Accessed 7 May 2019.
- Arikawa S, Rollins N, Newell ML, Becquet R. Mortality risk and associated factors in HIV-exposed, uninfected children. *Trop Med Int Health* 2016; 21:720–34.
- le Roux SM, Abrams EJ, Nguyen K, Myer L. Clinical outcomes of HIV-exposed, HIV-uninfected children in sub-Saharan Africa. *Trop Med Int Health* 2016; 21:829–45.
- Blanche S, Tylleskär T, Peries M, et al; ANRS 12174 Trial Group. Growth in HIV-1-exposed but uninfected infants treated with lopinavir-ritonavir versus lamivudine: a secondary analysis of the ANRS 12174 trial. *Lancet HIV* 2019; 6:e307–14.
- Debeaudrap P, Bodeau-Livinec F, Pasquier E, et al; ANRS-Pediacam study group. Neurodevelopmental outcomes in HIV-infected and uninfected African children. *AIDS* 2018; 32:2749–57.
- Biggar RJ, Henle W, Fleisher G, Böcker J, Lennette ET, Henle G. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int J Cancer* 1978; 22:239–43.
- de-Thé G. Epstein-Barr virus behavior in different populations and implications for control of Epstein-Barr virus-associated tumors. *Cancer Res* 1976; 36:692–5.
- Slyker JA, Casper C, Tapia K, et al. Clinical and virologic manifestations of primary Epstein-Barr virus (EBV) infection in Kenyan infants born to HIV-infected women. *J Infect Dis* 2013; 207:1798–806.
- Gantt S, Orem J, Krantz EM, et al. Prospective characterization of the risk factors for transmission and symptoms of primary human herpesvirus 6 infection among Ugandan infants. *J Infect Dis* 2016; 214:36–44.
- Petrara MR, Cattelan AM, Zanchetta M, et al. Epstein-Barr virus load and immune activation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Virol* 2012; 53:195–200.
- Ouedraogo DE, Tuailon E, Rubbo PA, et al. Close relationship between immunoglobulin secreting-cells and Epstein-Barr virus reservoir in patients infected with HIV. *J Med Virol* 2014; 86:30–7.
- Cederberg LE, Rabinovitch MD, Grimm-Geris JM, et al. Epstein-Barr virus DNA in parental oral secretions: a potential source of infection for their young children. *Clin Infect Dis* 2019; 68:306–12.
- Kusuhara K, Takabayashi A, Ueda K, et al. Breast milk is not a significant source for early Epstein-Barr virus or human herpesvirus 6 infection in infants: a seroepidemiologic study in 2 endemic areas of human T-cell lymphotropic virus type I in Japan. *Microbiol Immunol* 1997; 41:309–12.
- Condon LM, Cederberg LE, Rabinovitch MD, et al. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among Minnesota children: effects of race/ethnicity and family environment. *Clin Infect Dis* 2014; 59:501–8.
- Daud II, Coleman CB, Smith NA, et al. Breast milk as a potential source of Epstein-Barr virus transmission among infants living in a malaria-endemic region of Kenya. *J Infect Dis* 2015; 212:1735–42.
- Viljoen J, Tuailon E, Nagot N, et al. Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breast milk is associated with HIV-1 transmission by breast-feeding. *AIDS* 2015; 29:145–53.
- Ruck C, Reikie BA, Marchant A, Kollmann TR, Kakkar F. Linking susceptibility to infectious diseases to immune system abnormalities among HIV-exposed uninfected infants. *Front Immunol* 2016; 7:310.
- Jones CE, Naidoo S, De Beer C, Esser M, Kampmann B, Hesselning AC. Maternal HIV infection and antibody responses against vaccine-preventable diseases in uninfected infants. *JAMA* 2011; 305:576–84.
- Biggar RJ, Henle G, Böcker J, Lennette ET, Fleisher G, Henle W. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. II. Clinical and serological observations during seroconversion. *Int J Cancer* 1978; 22:244–50.
- Fleisher G, Henle W, Henle G, Lennette ET, Biggar RJ. Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *J Infect Dis* 1979; 139:553–8.
- Piriou E, Asito AS, Sumba PO, et al. Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. *J Infect Dis* 2012; 205:906–13.
- Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, et al. Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2012; 379:1234–44.
- Nagot N, Kankasa C, Tumwine JK, et al; ANRS 12174 Trial Group. Extended pre-exposure prophylaxis with lopinavir-ritonavir versus lamivudine to prevent HIV-1 transmission through breastfeeding up to 50 weeks in infants in Africa (ANRS 12174): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387:566–73.
- Mouinga-Ondémé A, Mabika-Mabika A, Alalade P, et al. Significant impact of non-B HIV-1 variants genetic diversity in Gabon on plasma HIV-1 RNA quantitation. *J Med Virol* 2014; 86:52–7.
- Viljoen J, Gampini S, Danaviah S, et al; World Health Organization/ANRS 1289 Kesho Bora Study Group. Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 55:290–8.
- Orozco AF, Jorgez CJ, Horne C, et al. Membrane protected apoptotic trophoblast microparticles contain nucleic acids: relevance to preeclampsia. *Am J Pathol* 2008; 173:1595–608.
- Fafi-Kremer S, Morand P, Barranger C, et al. Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. *J Mol Diagn* 2008; 10:78–84.
- Mogeni P, Williams TN, Omedo I, et al. Detecting malaria hotspots: a comparison of rapid diagnostic test, microscopy, and polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2017; 216:1091–8.
- Bharti AR, Saravanan S, Madhavan V, et al. Correlates of HIV and malaria co-infection in Southern India. *Malar J* 2012; 11:306.
- US Department of Health and Human Services; National Institutes of Health; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Division of AIDS. Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events, version 2.0 [November 2014]. Available at: <https://rsc.niaid.nih.gov/sites/default/files/daids-ae-grading-table-v2-nov2014.pdf>. Accessed 7 May 2019.
- World Health Organization. WHO child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009. Available at: <https://www.who.int/nutrition/publications/severemalnutrition>. Accessed 7 May 2019.
- World Health Organization. Interim WHO clinical staging of HIV/AIDS and HIV/AIDS case definitions for surveillance: African region. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005.
- Gumbo H, Chasekwa B, Church JA, et al. Congenital and postnatal CMV and EBV acquisition in HIV-infected Zimbabwean infants. *PLoS One* 2014; 9:e114870.
- Slyker JA, Casper C, Tapia K, et al. Accelerated suppression of primary Epstein-Barr virus infection in HIV-infected infants initiating lopinavir-ritonavir-based versus nevirapine-based combination antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2014; 58:1333–7.
- Ogolla S, Daud II, Asito AS, et al. Reduced transplacental transfer of a subset of Epstein-Barr virus-specific antibodies to neonates of mothers infected with plasmodium falciparum malaria during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22:1197–205.
- Sanosyan A, Rutagwera DG, Molès JP, et al; ANRS 12174 Trial Group. Increased Epstein-Barr virus in breast milk occurs with subclinical mastitis and HIV shedding. *Medicine* 2016; 95:e4005.
- Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci* 1991; 302:220–3.
- Ouedraogo DE, Makinson A, Vendrell JP, et al. Pivotal role of HIV and EBV replication in the long-term persistence of monoclonal gammopathy in patients on antiretroviral therapy. *Blood* 2013; 122:3030–3.
- Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 1985; 75:1003–10.
- Kerr JR. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *J Clin Pathol* 2019; 72:651–8.



Letters to Editor

High Level of HBV DNA Virus in the Breast Milk Seems not to Contraindicate Breastfeeding

Published: July 01, 2015

Received: April 21, 2015

Accepted: May 11, 2015

**Citation:** Montoya-Ferrer A., Zorrilla A.M., Viljoen, Molès J.P., Newell M.L., Van de Perre P., Tuailon E. High Level of HBV DNA Virus in the Breast Milk Seems not to Contraindicate Breastfeeding. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015, 7(1): e2015042, DOI: <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2015.042>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dear Editor,

Breastfeeding is recommended by the World Health Organization regardless of mother’s hepatitis B virus (HBV) status since breast milk is not considered as an efficient pathway for HBV perinatal transmission.<sup>1</sup> However, concerns about a possible risk of HBV transmission through breastfeeding arises under conditions favoring an increase of HBV DNA viral load in breast milk, particularly among unvaccinated children.<sup>2,3</sup>

We present here a case of an HIV-HBV co-infected mother who exposed her child to a significant HBV infectious inoculum via breast milk, likely due to a hepatitis flare or an acute HBV infection.

The mother-child couple was enrolled in the Kesho Bora study; a randomized controlled trial evaluating maternal prophylactic strategies to reduce HIV transmission through breastfeeding.<sup>4</sup> At week 6 post-delivery, a > ten fold elevation of alanine transaminase (ALT: 750 IU/L) was observed in a 20 years old mother. This mother was included in the control arm receiving short course antenatal zidovudine and single-dose intrapartum nevirapine in accordance with per national guidelines at the time. Serological testing confirmed HBV infection (positivity for HBsAg) and

ruled out hepatitis A and C infections. Serum and breast milk samples were retrospectively assessed for HBV DNA levels at week 2 and 12 using a standardized qPCR method (HBV Generic PCR, Omunis, Montpellier, France). Significant levels of HBV DNA were found in both left and right breast milk samples at week 2 post-delivery (> 10<sup>3</sup> log<sub>10</sub> HBV DNA IU/mL) whereas, ALT level was normal (12 IU/ml). HBsAg levels were also quantified in breast milk (>10<sup>1</sup> IU/ml) using a quantitative assay (Architect HBsAg QT assay, Abbott, Chicago, IL). A dramatic decrease in the levels of HBV DNA and HBsAg was observed in both serum and breast milk at week 12 post-delivery (**Table 1**). Serum and breast milk became negative for HBsAg 6 months after delivery without detection of anti-HBs antibody. The newborn was infected neither by HIV nor by HBV despite a vaccine schedule starting at week 6. Protective anti-HBs titers were observed in response to HBV vaccination (>ten mIU/mL) at month 12. We estimate that the intestinal mucosa of the infant was in contact with more than one million HBV particles/per day based on a daily consumption of 300 ml during the first weeks of life. Although HBV infection is a major health concern worldwide, very few studies have explored HBV DNA

Table 1.

	W2 post delivery			W12 post delivery		
	Plasma	BM right	BM left	Plasma	BM right	BM left
HBV DNA PCR (IU/mL)	7.36 x 10 <sup>9</sup>	6.60 x10 <sup>3</sup>	4.27 x 10 <sup>3</sup>	3.69 x 10 <sup>2</sup>	<1 x 10 <sup>2</sup>	<1 x 10 <sup>2</sup>
HBsAg detection	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative
HBsAg level (IU/mL)	1.25 x 10 <sup>5</sup>	1.10 x 10 <sup>1</sup>	1.51 x 10 <sup>1</sup>	2.32 x 10 <sup>1</sup>	<0.05	<0.05
HBeAg detection	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative
HIV RNA (copies/mL)	1.82 x 10 <sup>4</sup>	2.81 x 10 <sup>2</sup>	4.71 x 10 <sup>3</sup>	2.25 x 10 <sup>4</sup>	1.24 x 10 <sup>3</sup>	6.67 x 10 <sup>2</sup>
ALT (IU/L)	26			17		
CD4 T cells count (cells/μL)	426			311		

BM: acellular breast milk

<1 x 10<sup>2</sup> HBV DNA IU/mL: detected but not quantified





in breast milk. HBV DNA has been detected in the colostrum of mothers tested positive for HBe antigen using PCR and Southern blot hybridization<sup>5</sup> and in banked human milk samples using a nested PCR<sup>6</sup>.

Recently, HBV DNA was tested in serum and breast milk using a standardized quantitative PCR method in HIV-HBV coinfecting mothers who were under lamivudine-containing antiretroviral regimen from the 25th week of pregnancy<sup>7</sup>. At delivery, 11/26 (42%) women had significant HBV DNA levels in serum (ranging from 3.3 to >8 log<sub>10</sub> IU/mL) that steadily decreased at months 1, 3, and 6 postpartum (median of 5.2, 4.5 and 2.8 log<sub>10</sub> IU/mL respectively). HBV DNA was detected in breast milk from three HBV viremic women (33%) and four out of 24 breast milk samples (17%). When detectable, HBV DNA levels in breast milk were low in all cases ranging from 1.18 to 2.20 log<sub>10</sub> IU/ml, suggesting that level of HBV DNA in breast milk might always be negligible. The rate of HBV infection was also assessed among 23 HIV-HBV exposed children along the two years study period. Diagnosis of transient HBV infection was made in four children whereas other three children acquired HBV infection during the postnatal period (first HBsAg positive test at 12 months in one case and 24 months in the other two cases). Pirillo et al observed that those 7 children were exposed to the highest HBV infectious inoculum, not only at delivery, but also during all the postnatal period, since their mothers presented the highest levels of HBV DNA in serum. However, no correlation was found between HBsAg positivity and HBV DNA levels in breast milk.

In our case, exposure to a larger amount of HBV infectious particles via breast milk was detected, but the child, who was correctly vaccinated, was not infected with HBV. This result seems to confirm that breastfeeding is not an effective route of HBV transmission during the perinatal period, as previously reported in clinical studies.<sup>2,3</sup> However, in contrast with the results of Pirillo et al, our data show that HBV exposition via breast milk could be significant,

especially during a high HBV replicative phase. HBV exacerbations or hepatitis flares often occur among chronic HBV infected mothers after pregnancy leading to higher levels of HBV replication in the blood<sup>8,9</sup>. In our case, an accurate differential diagnosis between an acute HBV infection and a hepatitis flare could not be made since the time of HBV infection was unknown. A typical elevation of ALT 6 to 10 weeks after delivery preceding the upsurge of HBV DNA levels suggested a hepatitis flare.<sup>10</sup> However, this mother also experienced HBsAg clearance within six months, as often occurs in acute HBV infections.<sup>11</sup>

Hepatitis flares or acute HBV infections in chronic HBV infected patients do not usually require antiviral treatment since most of the episodes resolve spontaneously.<sup>12</sup> In pregnant women, the risk of fulminant or severe hepatitis following hepatitis flares or acute HBV infections does not appear increased (9). However, as in general population, those episodes may progress to a fulminant liver failure and must be treated with nucleot(s)ide analogs and be evaluated for liver transplantation.<sup>12,13</sup> Due to its safety and better resistance profile, Tenofovir is currently the antiviral of choice for the treatment of severe acute HBV infection, and its efficacy has been demonstrated even in cases in which previous nucleoside analog treatment as lamivudine had failed.<sup>14</sup> Hence, Tenofovir provides a better efficiency during a hepatitis flare or a post-delivery acute HBV infection.

Exposure to a significant HBV infectious inoculum through breastfeeding should not always be considered negligible in children from HIV-HBV coinfecting mothers who do not receive any active antiviral treatment against HBV. However, cumulative exposure during lactation does not seem to contraindicate breastfeeding among correctly vaccinated children despite the immaturity of their intestinal mucosa.

**Acknowledgements.** We acknowledge the Kesho Bora study team in Burkina Faso, South Africa, and Kenya and all participating pregnant women and babies.

---

A Montoya-Ferrer<sup>1,2\*</sup>, AM Zorrilla<sup>1,3</sup>, J Viljoen<sup>1,4</sup>, JP Molès<sup>1</sup>, ML Newell<sup>4,5</sup>, P Van de Perre<sup>1,6</sup> and E Tuillon<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Université Montpellier 1, Inserm U1058, UM1 UFR Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, 34090, Montpellier, France

<sup>2</sup> Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, UMI 233, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, 80 av Augustin Fliche - 34295 Montpellier, France

<sup>3</sup> University of Florida College of Medicine, 1600 SW Archer Rd, Gainesville, Florida 32603, United States

<sup>4</sup> Africa Centre for Health and Population Studies, University of KwaZulu-Natal, R618 en route to Hlabisa, Somkhele, A2074 Rd, Mtubatuba 3935, Durban, South Africa

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, University of Southampton, Mailpoint 887, Institute of Developmental Sciences Building, Southampton General Hospital, Tremona Road, Southampton, Hants SO16 6YD, United Kingdom

<sup>6</sup> Département de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, 191 Avenue Doyen Giraud, Montpellier, 34295, France.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

Correspondence: Montoya-Ferrer, Ana. Département des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Gui de Chauliac - CHRU de Montpellier. 80 av Augustin Fliche - 34295 Montpellier Cedex 5, France. [a-montoyaferrer@chu-montpellier.fr](mailto:a-montoyaferrer@chu-montpellier.fr)

## References:

1. Hepatitis B and breastfeeding. World Health Organization. Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care. 1998; 4(7):20-1.
2. Shi, Z., Yang, Y., Wang, H., Ma, L., Schreiber, A., Li, X., Sun, W., Zhao, X., Yang, X., Zhang, L., Lu, W., Teng, J. & An, Y. Breastfeeding of newborns by mothers carrying hepatitis B virus: a meta-analysis and systematic review. Arch Pediatr Adolesc Med. 2011; 165(9):837-46. <http://dx.doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.72> PMID:21536948
3. Zheng, Y., Lu, Y., Ye, Q., Xia, Y., Zhou, Y., Yao, Q. & Wei, S. Should chronic hepatitis B mothers breastfeed? a meta analysis. BMC public health. 2011; 11:502. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-11-502> PMID:21708016 PMCID:PMC3141463
4. de Vincenzi I. Triple antiretroviral compared with zidovudine and single-dose nevirapine prophylaxis during pregnancy and breastfeeding for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 (Kesho Bora study): a randomised controlled trial. The Lancet infectious diseases. 2011; 11(3):171-80. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70288-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70288-7)
5. Lin HH, Hsu HY, Chang MH, Chen PJ, Chen DS. Hepatitis B virus in the colostrum of HBeAg-positive carrier mothers. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 1993; 17(2):207-10. <http://dx.doi.org/10.1097/00005176-199308000-00014> PMID:8229550
6. de Oliveira PR, Yamamoto AY, de Souza CB, de Araujo, N. M., de Andrade Gomes, S., Heck, A. R., de Castro Figueiredo, J. F. & Mussi-Pinhata, M. M. Hepatitis B viral markers in banked human milk before and after Holder pasteurization. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2009; 45(4):281-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.003> PMID:19473876
7. Pirillo MF, Scarcella P, Andreotti M, Jere, H., Buonomo, E., Sagnò, J. B., Amici, R., Mancini, M. G., Leone, P., Ceffa, S., Mancinelli, S., Marazzi, M. C., Vella, S., Palombi, L. & Giuliano, M. Hepatitis B virus mother-to-child transmission among HIV-infected women receiving lamivudine-containing antiretroviral regimens during pregnancy and breastfeeding. Journal of viral hepatitis. 2015; 22(3):289-96. <http://dx.doi.org/10.1111/jvh.12301> PMID:25174900
8. ter Borg MJ, Leemans WF, de Man RA, Janssen HL. Exacerbation of chronic hepatitis B infection after delivery. Journal of viral hepatitis. 2008; 15(1):37-41. PMID:18088243
9. Jonas MM. Hepatitis B and pregnancy: an underestimated issue. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2009; 29 Suppl 1:133-9.
10. Chang ML, Liaw YF. Hepatitis B flares in chronic hepatitis B: Pathogenesis, natural course, and management. Journal of hepatology. 2014. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. Journal of hepatology. 2012; 57(1):167-85.
11. Puri P. Acute Exacerbation of Chronic Hepatitis B: The Dilemma of Differentiation from Acute Viral Hepatitis B. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 2013; 3(4): 301-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2013.08.014> PMID:25755518 PMCID:PMC3940633
12. Chang ML, Liaw YF. Hepatitis B flares in chronic hepatitis B: pathogenesis, natural course, and management. Journal of hepatology. 2014; 61(6):1407-17.
13. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. Journal of hepatology. 2012; 57(1):167-85 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.033> PMID:25178562
14. Gerada J, Borg E, Formosa D, Magro R, Pocock J. Tenofovir as rescue therapy following clinical failure to Lamivudine in severe acute hepatitis B. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases. 2013; 5(1):e2013035. <http://dx.doi.org/10.4084/mjh.2013.035> PMID:23795273 PMCID:PMC3684318