

05341

2
30



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
División de Estudios de Posgrado**

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS A
HERPESVIRUS EN ADULTOS SANOS**

T E S I S

**Que para obtener el Diploma de la
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA**

p r e s e n t a

CLAUDIA MERCEDES MEJIA SIERRA

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El estudio enfoca la prevalencia de anticuerpos a herpesvirus simple tipo 1 y 2 (HSV1 y 2), virus varicela-zoster (VZV) y citomegalovirus (CMV). Los resultados fueron obtenidos por el método de ELISA en 44 adultos sanos donadores de sangre del INC.

Este estudio incluye también una revisión de las generalidades de cada uno de los virus mencionados y la interacción con el sistema inmune del huésped. Además describo el efecto de la interacción del sistema inmune sobre el virus y sobre la célula huésped infectada por el virus.

También se menciona:

- la importancia de las infecciones herpéticas en pacientes inmunosuprimidos y transplantados y
- las posibles fuentes de infección como son las transfusiones sanguíneas y los trasplantes de órganos y sus implicaciones.

Los resultados demuestran que la prevalencia de infecciones herpéticas en la población estudiada es del 100% para HSV y VZV y para CMV es del 86%.

El estudio confirma la hipótesis de que los herpesvirus tienen una circulación muy amplia.

ABSTRACT

The study focuses on antibody prevalence against type 1 and type 2 of herpes simplex viruses (HSV1 and HSV2), varicella-zoster virus (VZV) and cytomegalovirus (CMV). The results were obtained using the ELISA method on 44 healthy, adult blood-donators of the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INC).

This study also includes a general review of each above mentioned virus and its interaction with the host immune system. Furthermore, I described the immune system effect on the virus and on the virus infected host cell from such interaction.

Mentioned are also:

- the importance of the herpetic infections in transplanted and immunosuppressed patients and
- the possible sources of infection which can be blood transfusion or organ transplant and their consequences.

The results shows that prevalence of herpetic infections in the studied population is 100% for HSV and VZV and 86% for CMV.

The study confirms the hypothesis that herpes-viruses are extremely wide spreaded.

INDICE

I. ANTECEDENTES

II. INTRODUCCION

III. FAMILIA HERPESVIRIDAE

1. Virus Herpes Simple tipo 1 Y 2.

A. Estructura.

B. Patogenia.

C. Manifestaciones clínicas.

2. Virus de la Varicela-Zoster.

A. Estructura.

B. Patogenia.

C. Manifestaciones clínicas.

3. Citomegalovirus.

A. Estructura.

B. Patogenia.

C. Manifestaciones clínicas.

IV. RESPUESTA INMUNE

A. Interacción entre los herpesvirus y el sistema inmune.

B. Los efectos de los herpesvirus sobre el sistema inmune.

Respuesta inmune humoral.

Respuesta inmune celular.

- C. Los efectos del sistema inmune en infecciones por herpesvirus.
- D. Los efectos del sistema inmune en las células infectadas por herpesvirus:
 - 1. Mecanismos líticos.
 - 2. Mecanismos no líticos.
- V. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO
 - A. Métodos no Inmunológicos.
 - B. Métodos Inmunológicos.
- VI. MATERIALES Y METODOS
 - A. Sueros.
 - B. Metodología.
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSION
- IX. CONCLUSIONES
- X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

I. ANTECEDENTES

Las infecciones más comunes de origen viral que afectan al hombre son las herpéticas (1). Esas infecciones son causadas por los miembros de la familia herpesviridae. La familia herpesviridae está compuesta por 7 herpesvirus humanos: herpes simple tipo 1 y 2 (HSV 1 y 2), virus varicela-zoster (VZV), virus Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano tipo 6 (HHV 6) y el herpesvirus humano 7 (HHV 7), recientemente reportado (2).

La importancia clínica de las infecciones herpéticas, en especial la de los virus en estudio HSV 1 y HSV 2, VZV y CMV, radica en la alta morbilidad y en la capacidad que tienen los herpesvirus de establecer una infección latente después de la infección primaria. La tendencia de reactivación de la infección latente y la producción de infecciones recurrentes, difiere de acuerdo al virus y a los factores del huésped, tales como la edad y el estado inmunológico. En huéspedes inmunocomprometidos el riesgo de superinfección de las lesiones y la inmunosupresión inducida por la infección viral, en sí, son de gran relevancia (1). El fenómeno de latencia puede convertir al individuo infectado en un portador asintomático, dato de gran importancia en la epidemiología de la enfermedad. En esta fase, el diagnóstico se establece al detectar la presencia de anticuerpos contra los herpesvirus, así se ayuda a disminuir las fuentes de infección como son las transfusiones sanguíneas y los trasplantes de órganos. Se ha reportado en la literatura que la inmunosupresión terapéutica en los trasplantes, hace que las infecciones por HSV 1 y 2, VZV y CMV sean las más frecuentes (3,4,5,6,7). Estas infecciones pueden ser adquiridas después del trasplante del órgano de un donador seropositivo (8) o por la reactivación de la infección en un receptor seropositivo, debido a la terapia inmunosupresora (3). Por esta razón es importante conocer la seroprevalencia de las infecciones por herpesvirus en el Instituto Nacional de

Cardiología Ignacio Chávez donde con relativa frecuencia se llevan a cabo transplantes; con el fin de tomar medidas preventivas y disminuir fuentes de infección exógena que puedan inducir en el paciente manifestaciones clínicas graves, tales como el rechazo del órgano transplantado y la pérdida de la vida misma.

II. INTRODUCCION

Hacia fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX se identificaron los primeros virus. En esta época Beijerinck e Ivanovski identificaron el virus del mosaico del tabaco y Loeffler y Frosch descubrieron el virus de la enfermedad de pies y boca (9). Posteriormente se llevó a cabo el descubrimiento del primer virus causal de la fiebre amarilla en humanos y la patogenia de la enfermedad por Walter Reed y la Army Yellow Fever Commission (10). La composición de un virus fue determinada por primera vez en 1933 por Schlesinger, el cual demostró que un bacteriófago contenía sólo proteína y DNA (11). Pocos años después, Stanley cristalizó el virus del mosaico del tabaco, demostrándose que estaba constituido por RNA y proteína (12). En la década de 1940, usando bacteriófagos como modelo, Delbruck, Luria y otros, establecieron muchos de los principios básicos de la genética y biología molecular microbianas e identificaron los principales sucesos en el ciclo de crecimiento viral (11,13).

Los trabajos exhaustivos realizados en las últimas décadas con muchos virus han confirmado y generalizado estos hallazgos. En la actualidad se acepta que todos los virus contienen un tipo de ácido nucleico, DNA o RNA (14). El DNA y RNA puede ser de cadena única o doble y pueden tener una forma circular (cerrada) o lineal (abierta). El ácido nucleico viral está envuelto en una cubierta proteínica o cápside compuesta por múltiples subunidades proteínicas casi idénticas llamadas capsómeros. La combinación del ácido nucleico y la cápside proteínica que lo rodea, se denomina **nucleocápside**. Toda la unidad infecciosa se llama **virión**, el cual a su vez puede estar rodeado por una bicapa lipídica asociada a proteínas llamada **envoltura** (15,16).

Los virus son incapaces de replicarse por si solos debido a que los viriones carecen de constituyentes fundamentales para el crecimiento y multiplicación, por tal motivo deben emplear los sistemas generadores de ATP, los sistemas enzimáticos necesarios para la síntesis de sus ácidos nucleicos y proteínas, así como precursores (ribosomas, RNA de transferencia) de la célula huésped (17). El ácido nucleico viral contiene la información necesaria para programar a la célula huésped infectada para que sintetice varias macromoléculas virales específicas requeridas para la producción de la progenie viral (18), por ejemplo, los retrovirus contienen RNA en su genoma y transmiten su código genético como RNA que es transcrito a DNA por una enzima viral llamada transcriptasa reversa e incorporado al genoma del huésped. Esta información fluye de RNA a DNA en oposición al dogma central (19). El virus debe utilizar la maquinaria celular para su provecho convirtiéndose en un parásito intracelular obligatorio. Esta necesidad puede traer como consecuencia: 1) infección productiva con cambios en la estructura celular llamados también efectos citopáticos (CPE). Algunos de los CPE más comunes producidos por la infección viral son los cambios morfológicos de la célula (la célula puede adquirir una forma redondeada, puede haber lisis celular, formación de sincitios o formación de cuerpos de inclusión). Muchos de estos CPEs son efectos secundarios de la replicación viral (20); 2) infección persistente, por lo cual el virus puede permanecer en la célula en una forma latente y ser reactivado intermitentemente a lo largo de la vida del huésped, para causar una infección sintomática o asintomática y 3) transformación celular, produciendo cáncer en el huésped (21).

III. FAMILIA HERPESVIRIDAE

Los virus de la familia herpesviridae poseen un centro de DNA de doble cadena rodeado de una capa proteínica que presenta simetría icosaédrica regular (cápside) de 100 nm de diámetro formada por 162 capsómeros prismáticos. La envoltura externa del virus es una membrana que contiene lípidos (cubierta) que deriva de la membrana celular modificada y que se adquiere conforme la cápside emerge a través de la membrana nuclear interna de la célula huésped. Entre la cápside y la doble capa lipídica de la cubierta, se halla el tegumento, formado por varias proteínas virales. El DNA genómico contiene secuencias terminales e internas, formadas por los componentes L y S que están unidos covalentemente y que se orientan de manera diferente en cada subfamilia y género. El virión está compuesto por más de 30 proteínas estructurales (22).

La interacción entre el virus y una célula blanco comienza con la fijación de la partícula viral en la superficie celular (23). Este proceso es iniciado por una colisión al azar entre una partícula viral y la superficie celular. Una unión más estrecha es facilitada por las condiciones iónicas y de pH, apropiadas en el medio extracelular. La unión puede involucrar la interacción entre proteínas específicas en la superficie viral (proteína de unión del virus [PUV]) y receptores específicos en la membrana celular blanco. Se ha identificado la naturaleza de la PUV de cierto número de virus. En el caso de los virus envueltos, la PUV típicamente es una de las glucoproteínas de la envoltura, como las glucoproteínas gB, gD y gH del herpes simple (24,25,26), gp III del virus varicela-zoster (27,28) y gp 86 del citomegalovirus (29). Una vez ocurrida la unión, el virus debe atravesar la membrana plasmática y luego la cápside debe sufrir una serie de cambios configuracionales (desnudamiento) que preparan al virus para la posterior

replicación. Muchos virus envueltos y no envueltos penetran a la célula por medio de un proceso análogo a la endocitosis mediada por receptores de ligando no virales como hormonas, factores de crecimiento y toxinas (30,31). En el caso de los herpesvirus, esto puede estar mediado por fusión directa de la envoltura viral con la membrana externa de células blanco, con posterior ingreso de la nucleocápside en el citoplasma (32). La cápside desnuda es transportada a los poros nucleares y el DNA es introducido en el núcleo (33). La transcripción, replicación del DNA viral y el ensamblaje de nuevas cápsides, tiene lugar en el núcleo. El DNA viral es transcrito por medio de la RNA polimerasa II del huésped con la ayuda de factores virales. Los productos de la expresión genética del virus son enzimas (como la timidincinasa y la desoxiribonucleico polimerasa) y proteínas ligadoras de DNA involucradas en la replicación del DNA viral (34).

I. HERPESVIRUS SIMPLE

A. ESTRUCTURA

El virus herpes simple (herpesvirus hominis) comparte muchas propiedades con los otros miembros de la familia herpesviridae. El genoma del virus del herpes simple es una molécula de DNA de doble filamento lineal de 96×10^6 daltons, lo bastante grande para codificar más de 60 productos genéticos (P.M. 15.000-275.000), de los cuales la mitad son polipéptidos estructurales del virión y los restantes son polipéptidos no estructurales e incluyen enzimas específicas del virus (timidincinasas (35), DNA polimerasa y desoxiribonucleasa). El genoma está conformado por dos componentes unidos covalentemente: un segmento largo (L) de aproximadamente 80×10^6 daltons y uno corto (S) de 20×10^6 daltons. La estructura del genoma es rara entre los virus de DNA, pues las dos secuencias de los nucleótidos únicas (U_L y U_S) están repetidas en forma antiparalela. A su vez, los dos componentes se pueden invertir uno respecto del otro, de tal modo que el DNA, aislado del virus, consta de cuatro isómeros que difieren en la orientación de sus componentes. El 50% aproximadamente de los genomas del herpesvirus simple tipo 1 (HSV-1) y HSV-2 son homólogos (36). Las secuencias homólogas están repetidas por todo el mapa genómico y la mayor parte de los polipéptidos especificados por un tipo viral tienen relación antigénica con los polipéptidos del otro tipo (37). Todos estos polipéptidos son antigénicos y poseen la capacidad de inducir respuestas inmunes dentro del huésped. Se han identificado tres clases de genes del HSV. Los genes Alfa son los primeros en expresarse, sin que requieran síntesis previa de proteína viral; algunos de ellos realizan la transcripción en células con infección latente. Los genes Beta del HSV necesitan la síntesis previa de una proteína Alfa pero no la replicación viral. Los genes Beta codifican enzimas y proteínas

reguladoras necesarias para la replicación del DNA. La tercera clase de genes del HSV, llamados Gama, necesitan que haya replicación del DNA para su expresión; la mayor parte de las proteínas estructurales del virus son gama. Estas proteínas estructurales del virión son de gran importancia inmunológica. Son aproximadamente 33 glicoproteínas designadas como polipéptidos del virión (VPs) y clasificadas por números seriados (38,39), todas son inmunogénicas y antigénicas y se expresan en la superficie de la célula infectada por el virus (40). Esas glicoproteínas son la gB (VP7 y VP8.5), gC (VP8), gD (VP17 y VP18), gE (VP12.3), gH/gG, y gI. Otra pequeña glicoproteína, llamada gH fue identificada recientemente por análisis de la secuencia del DNA (41). Además, la cápside intacta contiene 5 proteínas, llamadas VP5, VP19C, VP23, VP24 y una proteína pequeña, posteriormente descrita con un peso molecular de 12.000 daltons (42). Entre la envoltura y la cápside se encuentran proteínas como el factor Alfa trans inductor (AlfaTIF; ICP25; VP16), la proteína que impide la entrada al huésped (VHS), y una gran proteína asociada con el complejo que une la secuencia terminal del genoma del virus (43).

B. PATOGENIA

Al ingresar en sitios cutáneos, el HSV se replica localmente en las células epiteliales parabasales e intermedias, lo cual da como resultado la lisis de las células infectadas y la estimulación de una respuesta inflamatoria local. Esta serie de sucesos resulta en la lesión característica de infección superficial por HSV, es decir una vesícula de paredes delgadas sobre una base inflamatoria. Se forman células multinucleadas con degeneración por tumefacción, edema marcado y características inclusiones intranucleares de Cowdry tipo A. Estas lesiones son indiferenciables de las causadas por el virus de la varicela-zoster. Son afectados los vasos linfáticos y los

ganglios linfáticos regionales que drenan el sitio de infección primaria. Una mayor replicación viral puede dar como resultado viremia y diseminación visceral, dependiendo de la competencia inmune del huésped. En modelos murinos, la madurez de los macrófagos en el sitio de infección local ayuda a determinar si el virus va a permanecer local o a diseminarse (44). Posteriormente, son provocados otros mecanismos de defensa del huésped (ver respuesta inmune)(45,46), para prevenir la diseminación de la infección. No está claro si esos mecanismos funcionan en humanos, si bien es más probable que la infección se disemine en lactantes con mecanismos inmunes inmaduros así como en niños y en adultos inmunosuprimidos o desnutridos (44). La diseminación viral puede dar como resultado la infección de múltiples órganos incluyendo hígado, pulmones y sistema nervioso central.

Después de la infección primaria, el HSV puede establecerse latente en ganglios de nervios sensitivos por desplazamiento a través de vías nerviosas sensitivas (47,48,49,50). El mecanismo del establecimiento de la latencia en los miembros de esta familia no es bien conocido. Una vez en los ganglios, el DNA viral y posiblemente ciertas transcripciones de RNAm, pueden localizarse en las neuronas. El virus reactivado o la información genética viral reactivada parece que se disemina en forma periférica también por nervios sensitivos. La neurona parece ser única por cuanto la producción de un virus totalmente infeccioso no da como resultado la lisis celular. Es posible que, sólo los productos virales tempranos, sean producidos dentro de la neurona y que el ensamble replicativo viral ocurra en las células epiteliales. Una vez que el HSV se ha desplazado hacia sitios cutáneos, la diseminación continua de célula a célula y la limitación de la diseminación es el resultado de la activación de mecanismos inmunes (51). Durante la infección, el HSV induce frecuentemente fusión de células infectadas, similar al proceso con que el virión se fusiona con la membrana celular

durante la penetración del virus a la célula huésped. La fusión involucra un número de glicoproteínas de membrana esenciales para la entrada del virus a la célula (gB, gD, gH); dicha fusión puede llegar a producir inmunopatología en el huésped (52).

C. MANIFESTACIONES CLINICAS

Una infección primaria por HSV-1 con frecuencia es asintomática. La manifestación más común en infección primaria es la gingivostomatitis herpética aguda, que se presenta con mayor frecuencia en niños de 1 a 3 años de edad. El diagnóstico está dado por la edad del paciente y la presencia de lesiones vesiculosas y ulcerativas en la mucosa bucal, gingival, en la lengua y la faringe, acompañada de fiebre, dolor y malestar general. La enfermedad recurrente usualmente se manifiesta como herpes labialis con las típicas vesículas en las comisuras labiales. La mayoría de las infecciones primarias por herpes simple, en adultos y jóvenes, se manifiesta con infecciones oculares, produciendo una queratoconjuntivitis que puede ser unilateral o bilateral. La reactivación generalmente es unilateral y se caracteriza por queratitis, con ulceración dendrítica o compromiso del estroma corneal, causando disminución en la agudeza visual.

Las infecciones genitales por herpes simple son predominantemente causadas por el HSV-2 aunque el HSV-1 también puede llegar a producir el síndrome. Se ha observado un incremento en la frecuencia de herpes genital tipo 1 debido a los hábitos sexuales orogenitales. En varones, las lesiones vesiculares sobre una base eritematosa por lo general se presentan en el glande o en el cuerpo del pene. En la mujer, las lesiones pueden afectar la vulva, periné, nalgas, cuello uterino y vagina acompañado de secreción vaginal. La infección primaria en ambos sexos, puede asociarse a disuria, retención urinaria y algunas veces a meningitis aséptica sobre todo en pacientes

inmunocomprometidos. La recurrencia se asocia a síntomas sistémicos menos severos y un compromiso local menos extenso que en las lesiones primarias aunque puede presentar casos de meningitis aséptica (1).

El herpes simple puede causar varias complicaciones entre ellas la **encefalitis herpética**, siendo la causa más común de encefalitis fatal esporádica en los Estados Unidos; el **herpes neonatal**, secundario a una infección genital materna o por el paso del niño a través del canal del parto infectado; infección en el **huésped inmunocomprometido**, produciendo manifestaciones clínicas más severas; **hepatitis por herpes simple**, etc. También las infecciones por herpes simple pueden asociarse a otras entidades como el **eritema multiforme** y **cáncer** (1).

2. VIRUS DE LA VARICELA-ZOSTER

A. ESTRUCTURA

El virus varicela-zoster tiene simetría icosaédrica y posee un DNA bicatenario ubicado centralmente con una envoltura circundante. El tamaño total del virus es aproximadamente 150 a 200 nm y posee una envoltura lipídica con espículas glucoproteíicas (53). La cápside desnuda tiene un diámetro de aproximadamente 90 a 95 nm (54,55,56). El DNA contiene 125.000 pares de bases o aproximadamente 80 megadaltons y codifica aproximadamente 75 proteínas. La organización del genoma viral es similar a la de los otros herpesvirus. Hay regiones largas únicas (U^L), de 105 kilobases, y regiones cortas únicas (U^S), de 5.2 kilobases, en el genoma viral. Se han identificado 5 familias de glucoproteínas (gp) de virus varicela-zoster (VZV) la gp I, gp II, gp III, gp IV y gp V (28). Estas glicoproteínas estructurales representan el marcador primario para inmunidad humoral y celular. El VZV se asocia fuertemente con células y se disemina de una célula a otra por contacto directo (57).

B. PATOGENIA

El VZV produce dos entidades clínicas diferentes. **La varicela** es la infección primaria y es el resultado de la exposición de un sujeto susceptible al virus. La varicela, es una infección ubicua y sumamente contagiosa, suele ser una enfermedad benigna de la infancia caracterizada por una erupción eritematosa y vesiculosa generalizada. Al reactivarse el VZV latente, la enfermedad se presenta como una erupción vesiculosa circunscrita a un dermatoma y acompañada, generalmente, de dolor intenso, este fenómeno se conoce como **herpes zoster o zona**. Es probable que la transmisión ocurra por vía respiratoria, seguida de replicación localizada en un lugar no

precisado que produce diseminación en el sistema fagocítico mononuclear y finalmente viremia. La presencia de viremia en enfermos con varicela se apoya en el carácter disperso y extenso de las lesiones cutáneas y puede verificarse en casos seleccionados por aislamiento del virus en la sangre (58). A medida que la replicación viral progresa, las células epiteliales sufren cambios degenerativos caracterizados por tumefacción, con la posterior aparición de células gigantes multinucleadas eosinófilas (59).

C. MANIFESTACIONES CLINICAS

VARICELA. Clínicamente, la varicela se manifiesta por una erupción, fiebre ligera y malestar, aunque algunos enfermos tendrán pródromos 1 a 2 días antes del comienzo del exantema. En sujetos inmunocompetentes la varicela es una enfermedad benigna que se acompaña de lasitud y fiebre de 37.8 a 39.4°C de 3 a 5 días de duración. Las lesiones cutáneas, sello característico de la infección, constan de maculopápulas, vesículas y costras en diversas fases evolutivas. El paso de maculopápulas a vesículas se produce en cuestión de horas a días. Las lesiones aparecen en tronco y cara y rápidamente alcanzan otras zonas del cuerpo. La mayor parte de ellas son pequeñas, tienen una base eritematosa, y un diámetro de 5 a 10 mm. Los brotes sucesivos aparecen a intervalos de 2 a 4 días. Puede haber lesiones en la mucosa faríngea y vaginal. Los sujetos inmunodeprimidos, tanto niños como adultos, tienen lesiones más numerosas, a menudo con una base hemorrágica y tardan más tiempo en curar (60). Estos individuos tienen más riesgo de complicaciones viscerales. La complicación infecciosa más frecuente de la varicela es la sobreinfección bacteriana secundaria de la piel, que suele deberse a *Streptococcus pyogenes* o a *Staphylococcus aureus* y que proviene de la excoriación de las lesiones cutáneas causada por el rascado. La localización extracutánea más frecuente de la enfermedad, en niños, es el

sistema nervioso central y provoca una ataxia cerebelosa aguda que aparece en la etapa de erupción (61). Se trata de una complicación benigna de la infección por VZV en niños. También pueden aparecer meningitis aséptica, encefalitis, mielitis y síndrome de Reye. La neumonía por varicela es la complicación más grave de esta infección, siendo más frecuente en adultos que en niños. Se acompaña de taquipnea, tos, disnea y fiebre, son frecuentes también la cianosis, el dolor torácico de tipo pleurítico y la hemoptisis. La resolución de la neumonitis es paralela a la mejoría de la erupción cutánea. Otras complicaciones de la varicela son: miocarditis, lesiones corneales, nefritis, artritis, diátesis hemorrágica, glomerulonefritis aguda y hepatitis. La afección hepática, diferente del síndrome de Reye, es frecuente; se caracteriza por elevación de las enzimas hepáticas y generalmente es asintomática.

HERPES ZOSTER. Es una enfermedad esporádica debida a la reactivación del virus latente situado en los ganglios de las raíces posteriores. Aparece a cualquier edad, pero principalmente en ancianos e inmunodeprimidos. Se caracteriza por una erupción vesiculosa unilateral circunscrita a un dermatoma, acompañada de dolor intenso. Los dermatomas que más a menudo se afectan van desde D3 a L3. Si se afecta la rama oftálmica del trigémino se produce el zoster oftálmico. La reactivación del virus en niños suele ser benigna, pero en adultos la neuritis aguda y la neuralgia posherpética pueden ser debilitantes. El comienzo de la enfermedad se anuncia por dolor en el dermatoma y va seguida de una erupción maculopapulosa eritematosa que, rápidamente evoluciona hacia la vesiculación. Si se afectan las ramas del trigémino, pueden aparecer lesiones en cara, boca, ojos o lengua. Las lesiones aparecen en el conducto auditivo y la lengua cuando se afecta la rama sensitiva del nervio facial. La complicación más debilitante del herpes zoster es el dolor que acompaña a la neuritis aguda y a la

neuralgia posherpética. Puede aparecer afectación del sistema nervioso central después del herpes zoster localizado (1).

3. CITOMEGALOVIRUS

A. ESTRUCTURA

El citomegalovirus (CMV) como los demás miembros de la familia herpesviridae contiene un DNA de doble cadena, una cápside proteica, una cubierta lipoproteica y simetría icosaédrica, se replica en el núcleo celular y puede originar una infección latente o una infección lítica productiva. El genoma del citomegalovirus humano es extremadamente grande, con un tamaño estimado de 65-68 nm (62), que corresponde aproximadamente a 240 kilobases pares con un peso molecular de $150-155 \times 10^6$ (62,63,64,65). El genoma del CMV tiene dos componentes uno largo (L) y otro corto (S) al igual que los otros herpesvirus (64). Posee glicoproteínas estructurales, tales como, la gp86 que se une al receptor específico en la célula huésped y permite su entrada (10). La replicación del virus se acompaña de la producción de grandes inclusiones intranucleares y de inclusiones citoplasmáticas más pequeñas (66).

B. PATOGENIA

La infección primaria se acompaña de una enérgica respuesta celular, que favorece el desarrollo de un síndrome de mononucleosis, con la aparición de linfocitos atípicos en sangre periférica (66). La activación polifuncional de linfocitos B por el virus, contribuye a la aparición de factores reumatoides y otros autoanticuerpos durante la mononucleosis por CMV (67). Una vez adquirido el virus durante la infección primaria asintomática o sintomática, el CMV persiste indefinidamente en los tejidos del huésped en una fase latente. Los síndromes de reactivación del CMV aparecen con frecuencia si hay compromiso en la inmunidad mediada por linfocitos T (inmunosupresión) (68).

C. MANIFESTACIONES CLINICAS

La mayoría de las infecciones por Citomegalovirus son asintomáticas en individuos sanos. Los síndromes clínicos incluyen: Infecciones neonatales y congénitas, mononucleosis con anticuerpo heterófilo negativo, citopenia hematológica y anemia hemolítica. En pacientes inmunocomprometidos, incluyendo síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)(69) y en pacientes organotransplantados pueden presentarse manifestaciones clínicas como neumonitis, retinitis, colitis, esofagitis y encefalitis por infección con CMV (1).

IV. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune puede operar positiva o negativamente, generando inmunopatología en los diferentes tipos de células con las que interactúa (ver Figura 1).

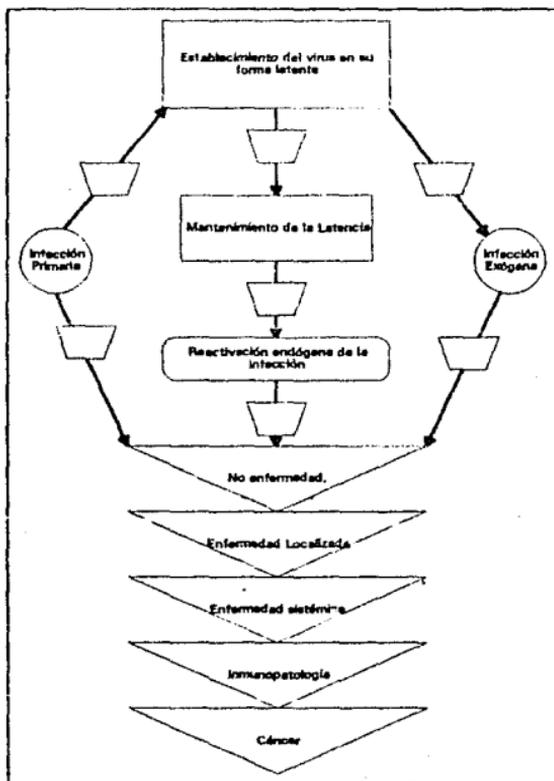


Figura 1. Diferentes niveles en los que pueden operar positiva o negativamente los mecanismos inmunes en las infecciones herpéticas. En la parte superior de la gráfica se muestra las posibles procedencias del virus infeccioso -de una infección primaria, una reinfección exógena, de una infección persistente (latencia)- y los posibles niveles (representados por rombos) en los que los mecanismos inmunes pueden influir para el establecimiento, mantenimiento, o reactivación de la infección latente. En la parte inferior se describen los posibles eventos que ocurren en el huésped infectado. (Tomado de la referencia 70)

Los resultados de una infección por herpesvirus pueden tener múltiples formas que dependen de los diferentes efectores del sistema inmune. La infección puede ser primaria productiva, ocurriendo en un individuo que no se ha expuesto al virus, y el resultado puede ser una infección sintomática o asintomática. Una infección primaria puede ser diferenciada de una infección inicial que ocurre en un individuo con exposición previa al virus. Esta diferenciación es importante desde el punto de vista inmunológico ya que en el primer caso el huésped no tiene memoria inmunológica y su respuesta inmune hacia la infección viral es un fenómeno de *novo*. Un segundo tipo de infección es la **recurrente**, que está asociada con reactivación del virus latente causando una infección asintomática o sintomática. Tercero, es posible la transformación celular y la aparición de neoplasia por infecciones herpéticas. Finalmente, pueden estar involucrados algunos eventos inmunopatológicos ejemplificados por algunas reacciones alérgicas a los herpesvirus (21).

A. INTERACCION ENTRE LOS HERPESVIRUS Y EL SISTEMA INMUNE.

En la interacción entre los herpesvirus y el sistema inmune se observan dos perspectivas diferentes pero interdependientes, así: la primera, el efecto del virus sobre las células que participan en la respuesta inmune como podrían ser los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos-monocitos y los polimorfonucleares, y la segunda, el efecto del sistema inmune sobre el virus y sobre la célula huésped infectada por el virus (21,71).

En la figura 2 se explican esquemáticamente las posibles interacciones entre los herpesvirus y el sistema inmune y son señalados los cambios que ocurren en la superficie de las células infectadas.

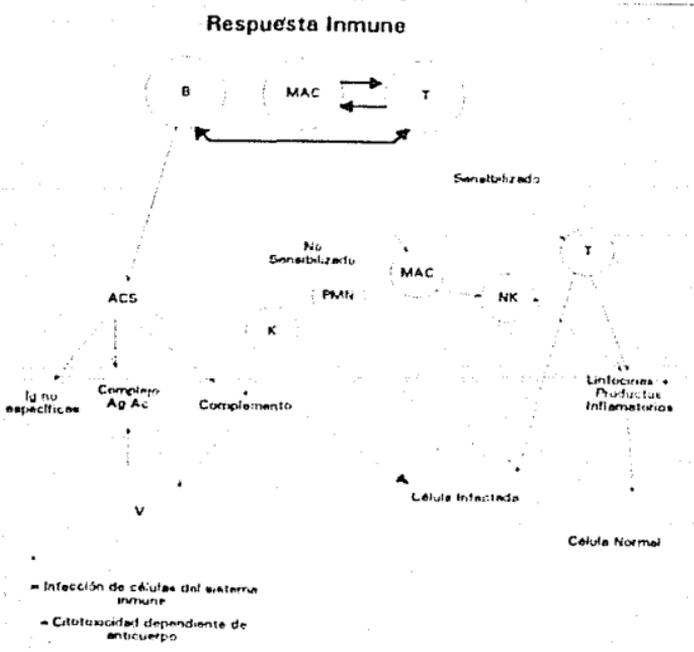
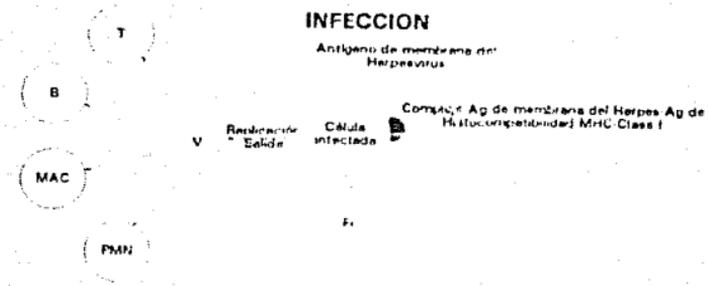


Figura 2

Figura 2. Interacciones entre el sistema inmune y los herpesvirus. En la parte superior de la gráfica (izquierda) muestra las células infectadas por los herpesvirus que están involucradas en la resistencia del huésped: Linfocitos T y B; MAC, macrófagos-monocitos; PMN, leucocitos polimorfonucleares. A la derecha el efecto de la infección viral sobre las expresión de Ags de superficie de la membrana de células del sistema inmune u otras células. Se expresan antígenos de membrana (MA) que pueden ser derivados de la envoltura del virus y los antígenos que se asocian al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase I). Además Receptores Fc para la IgG encontrados en la membrana citoplasmática de las células infectadas. En la parte central se observan las células que participan en la respuesta inmune específica inducida por nuevos virus o por los antígenos de membrana. La parte inferior muestra las posibles vías de los productos de la respuesta inmune -anticuerpos, células T sensibilizadas, y linfocinas- para afectar al virus, la célula infectada o células normales adyacentes. También se muestran los efectores inespecíficos como el complemento y leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, células NK y células K (Tomada de referencia 70)

B. LOS EFECTOS DE LOS HERPESVIRUS SOBRE EL SISTEMA INMUNE:

Los herpesvirus tienen la habilidad de estimular al sistema inmune para que produzca respuestas de tipo humoral y de tipo celular. La gama de efectos que producen los herpesvirus sobre el sistema inmune ponen de manifiesto la enorme complejidad de la relación huésped-parásito en estas infecciones.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Excepto por la interacción de los herpesvirus extracelulares con leucocitos, tales como macrófagos adultos, todos los mecanismos inmunes que han sido descritos y que operan directamente contra el virus extracelular involucran la participación del anticuerpo. Las propiedades biológicas de los anticuerpos contra los herpesvirus incluyen neutralización viral, sensibilización del virus, unión del anticuerpo al virión sin neutralización (72) y lisis de la célula infectada por el virus en cooperación con el complemento lítico o con leucocitos "asesinos" K que poseen receptores para Fc de inmunoglobulinas en su superficie. La unión del anticuerpo con el virus puede llevar a su neutralización si el anticuerpo es de la clase apropiada de inmunoglobulina, si posee gran avidéz y si está en suficiente concentración. La unión del anticuerpo lleva a la

"sensibilización" del virus. Así, la formación de complejos inmunes con la participación de otros factores como proteínas del complemento, puede dar lugar a la neutralización viral (73). Los anticuerpos neutralizantes en suero son de clases IgG o IgM (74). No se ha visto participación importante de las clases IgA, IgE e IgD, aunque se han encontrado en saliva y secreciones orales anticuerpos neutralizantes de la clase IgA (75). La síntesis de anticuerpos IgG neutralizantes por las células B requiere de la cooperación de las células T ayudadoras (6). Los anticuerpos neutralizantes están dirigidos directamente contra las glicoproteínas de la envoltura viral. En el caso de una infección reciente, el anticuerpo IgM aparece tempranamente durante el curso de una infección activa, neutraliza al virus levemente a diferencia de los anticuerpos IgG. Los primeros componentes del complemento, C1 y C4 son requeridos para una buena neutralización dependiente de complemento (73). La neutralización por anticuerpos de la clase IgG difiere cuantitativamente pero no cualitativamente de IgM. Los anticuerpos IgG en suero después de una infección primaria, neutralizan pocos virus por sí mismos y requieren al igual que la IgM, de la asistencia del complemento. La persistencia de IgG tardíamente es más potente neutralizador que IgM en ausencia de complemento. El virus sensibilizado con IgG o IgM puede ser recuperado de las lesiones herpéticas recurrentes. El mecanismo por el cual los herpesvirus son neutralizados no se conoce muy bien. Asumiendo que la neutralización involucra el recubrimiento de sitios de la envoltura viral que son necesarios para la adsorción y penetración del virus, el efecto sinérgico del anticuerpo con el complemento o del anticuerpo y el anti-anticuerpo, ha sido atribuido a un amplio bloqueo estérico de sitios críticos en la envoltura viral necesarios para la adsorción y penetración (73). La lisis del virus se lleva a cabo por un mecanismo independiente que no requiere la participación de los componentes del complemento en la fase tardía de la infección. El complemento y el anti-anticuerpo

parecen tener efectos de amplificación de la respuesta. Una hipótesis no confirmada es que la neutralización resulta en un cambio en la configuración y en las propiedades físico-químicas de las proteínas de la envoltura del virus después del ataque del anticuerpo. Los anticuerpos anti-*HSV* neutralizan electrocinéticamente la carga de la superficie. Esta alteración ha sido observada en células infectadas por *HSV*. Al neutralizar el virus o sensibilizarlo, el anticuerpo forma un complejo inmune (76). Los complejos inmunes tienen un gran número de efectos biológicos *in vitro*, incluyendo la habilidad para estimular la transformación linfoide en donadores previamente infectados; atenuan o modulan la producción de interferón e inhiben parcialmente la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Los complejos inmunes podrían fijar complemento y de ese modo generar mediadores inflamatorios *in vivo*. Todas las células que poseen receptores *Fc* en la superficie juegan un papel muy importante en la respuesta contra los herpesvirus. La interacción con estas células puede dar como resultado una inmunomodulación o posiblemente proporciona una vía para eliminar virus sensibilizados. La adición de leucocitos que poseen receptores *Fc* en la superficie a una suspensión que contiene *I₂G-HSV* sensibilizado, conlleva a una reducción de las partículas virales infecciosas (21).

Los virus han desarrollado varias estrategias para evadir la respuesta inmune del huésped. Los anticuerpos y las células *T* (citotóxicas, células de hipersensibilidad tardía) son los dos sistemas efectores virus-específicos primarios, responsables de controlar la infección viral. Los anticuerpos son capaces de reaccionar con virus libres o con células infectadas por el virus. El control es llevado a cabo por medio de la neutralización de los virus libres y por la muerte de las células infectadas a través de citotoxicidad mediada por el complemento o por la citotoxicidad de células dependientes de anticuerpo (ADCC). Las proteínas virales involucradas en esos

procesos son glicoproteínas de la superficie del virus o proteínas de la cápside. Los anticuerpos que participan en ADCC, o en la lisis de la célula infectada por medio del complemento, están dirigidos contra las glicoproteínas virales expresadas en la superficie celular. Obviamente, cuando hay cambios en su estructura o en la expresión de las glicoproteínas, éstas no son reconocidas por el anticuerpo y constituye un mecanismo de evasión de la inmunidad humoral. Otro potencial de escape del virus de los anticuerpos neutralizantes, es la presencia de un exceso de anticuerpos no neutralizantes que se unen al virus y bloquean la acción de los anticuerpos neutralizantes. Este bloqueo puede ser por impedimento estérico o por inducción de cambios conformacionales en la proteína viral, alterando el epítotope que es reconocido por el anticuerpo neutralizante (77). Se ha especulado que el HSV, por medio de la gE, posee la capacidad de unirse al fragmento Fc de las inmunoglobulinas y que la gC une el factor C3 del complemento para escaparse de la acción de los anticuerpos antivirales. La glicoproteína C del virus se une a el fragmento C3b e inhibe la asociación C3b y B. También se cree que le confiere protección al virus contra la neutralización mediada por el complemento, por un incremento en el catabolismo de la C3 convertasa (78). Los complejos virus-anticuerpo, son encontrados en infecciones crónicas, sugiriendo que el virus en esta forma no sea accesible a los anticuerpos neutralizantes (77). La importancia de estos efectos de inmunomodulación del virus, en el curso natural de la infección, son aún desconocidos (76).

RESPUESTA INMUNE CELULAR.

La respuesta inmune celular es llevada a cabo por las células T. En contraste a los anticuerpos que reconocen determinantes estructurales y conformacionales de las proteínas virales, las células T reconocen únicamente el antígeno viral procesado y en

asociación con las glicoproteínas del sistema mayor de histocompatibilidad. Las células T no reconocen virus libres pero son altamente efectivas, eliminando células infectadas por el virus y controlando el crecimiento viral por medio de citólisis y/o liberación de linfocinas. El receptor antígeno-específico de las células T reconoce pequeños fragmentos de péptidos derivados de proteínas virales en asociación con los antígenos del MHC de la clase I y de la clase II. En general, las células T CD8+ reconocen péptidos virales asociados a antígenos MHC de la clase I, mientras que las células T CD4+ reconocen los péptidos virales por medio de antígenos MHC de clase II (79). Los fragmentos peptídicos pueden ser derivados de cualquier proteína viral, ya sea estructural o no, por lo tanto, todas las proteínas pueden ser blancos potenciales de reconocimiento de las células T. Los factores limitantes de la respuesta son el procesamiento de las proteínas y la habilidad de los péptidos para unirse a las moléculas del MHC (afinidad por varios antígenos del MHC). Los receptores antígeno-específicos de las células T interactúan con células infectadas dependiendo de otras moléculas accesorias. Esas moléculas incluyen entre otras el LFA-1, CD2, CD4 y CD8. Sus ligandos en la célula infectada han sido recientemente identificados, uno de los ligandos para LFA-1 es el ICAM-1; el ligando para CD2 es LFA-3; y los ligandos para CD4 y CD8 son las moléculas del MHC de clase II y I respectivamente. En contraste con el reconocimiento del virus por los anticuerpos que involucran dos mecanismos, el reconocimiento de la célula infectada por las células T dependen de un gran número de moléculas. Las alteraciones en la estructura o expresión de algunas de las proteínas pueden interferir con las funciones efectoras de las células T y pueden llegar a evadir la respuesta inmune celular. Los linfocitos exhiben transformación blastoide cuando se exponen *in vitro* a HSV inactivado (80). Las principales poblaciones que se transforman, en humanos, son los linfocitos T y las células adherentes,

presumiblemente monocitos (81). Como una regla, la respuesta de transformación linfoide causada por los herpesvirus correlaciona con el estado serológico del donador, por ejemplo, hay transformación en linfocitos de individuos seropositivos (81). Respuestas positivas en seronegativos, reflejan la persistencia de las células de la memoria de una antigua infección primaria, con herpesvirus en la fase del declinamiento de los niveles no detectables de inmunoglobulinas en el suero (81). En el sitio local de la infección herpética el virus parece inducir en los linfocitos T la síntesis y liberación de varias linfocinas incluyendo LIF (factor inhibitorio de la migración de leucocitos), Intotoxinas, factor quimiotáctico derivado del linfocito y MIF (factor inhibitorio de la migración de macrófagos) (82,83,84).

C. LOS EFECTOS DEL SISTEMA INMUNE EN INFECCIONES POR HERPESVIRUS.

El paso de los herpesvirus de célula a célula puede tener dos rutas diferentes una, es por la vía del fluido extracelular y la segunda, a través de los puentes intercelulares entre células adyacentes (85). El sistema inmune ataca directamente no sólo a virus libres en el fluido extracelular, si no también a las células infectadas de tal forma que previene el paso de célula a célula. Idealmente, el ataque directo del sistema inmune a la célula infectada, solo es efectivo en un determinado tiempo del ciclo de infección, porque la progenie viral infectante puede ser propagada a células adyacentes a través de los puentes intercelulares. Las proteínas de los herpesvirus pueden ser expuestas en la superficie celular, incluyendo la adquisición de receptores Fc para IgG en la superficie, los cuales pueden estar codificados por genes virales o celulares. Los receptores Fc están asociados con la gpE de la envoltura del virión que se inserta en la membrana celular durante el proceso de entrada del virión en el HSV (86). La

alteración de la membrana causa una activación espontánea de algunos mecanismos efectoros, tales como la vía alterna del complemento, o puede facilitar interacciones no específicas con células asesinas, como las NK (asesinas naturales), por reducción en la carga negativa de la membrana de los leucocitos llamada fuerza de repulsión (87). Las células B pueden sintetizar, *in vitro*, pequeñas cantidades de anticuerpos citotóxicos dependientes de células. HSV *in vivo* induce proliferación policlonal de las células B en cultivo de células de bazo de ratón. Los cultivos de células infectadas por HSV, son capaces de producir sustancias similares a varias linfocinas, tales como MIF (88) e Interleucina-6 (IL-6) (89). La IL-6 (mediadora química), puede conferir resistencia relativa a la infección (90). La célula infectada puede transmitir señales humores que mimetizan al linfocito T. En el ratón, la liberación de interferón Beta puede aumentar el potencial citotóxico no específico, como podrían ser las células K quienes pueden destruir la célula infectada por herpesvirus (91). Este aumento puede ser de importancia durante una infección primaria temprana porque los linfocitos han sido sensibilizados por antígenos de herpesvirus o en una infección secundaria porque pueden iniciar la inflamación. Las células infectadas por el virus pueden liberar enzimas lisosomales que reaccionan con sistemas efectoros biológicos, tales como la cascada del complemento (92), por ejemplo, células infectadas por HSV liberan enzimas que provocan la ruptura del factor C5, dando como resultado la generación del factor quimiotáctico, llamado C5a (93).

D. LOS EFECTOS DEL SISTEMA INMUNE EN LAS CELULAS INFECTADAS POR HERPEVIRUS.

Se pueden clasificar estos efectos en: mecanismos líticos en los cuales el proceso resulta en la destrucción de la célula huésped, o mecanismos no líticos, en los cuales la replicación del virus no causa daño celular aparente.

1. MECANISMOS LITICOS.

Lisis de la célula infectada por el anticuerpo y el complemento. Roane y Roizman demostraron que cultivos de tejidos infectados con HSV pueden ser destruidos por suero inmune inactivado por calor y complemento de cobayos de Guinea. Los anticuerpos citolíticos detectados en suero humano HSV inmune han sido de las clases IgG e IgM. También se han identificado anticuerpos citolíticos para 3 glicoproteínas individuales del HSV. El suero humano inmune, posee en sus componentes alrededor del 80% de anticuerpos citolíticos, dirigidos contra determinantes tipo específicos. El papel del complemento por la activación de la vía alterna ha sido sugerido indirectamente y depende de anticuerpos del tipo IgM como mediadores de la neutralización viral, en los que se han involucrado los cuatro primeros componentes del complemento. Sin embargo, la vía clásica del complemento es la principal mediadora de la citólisis por medio del receptor Fc para IgG. También se ha visto que muchos tipos de células susceptibles a la replicación de los herpesvirus son relativamente resistentes a la lisis por anticuerpos y complemento mediadores de citólisis (AbC) y que esas células presentan en la superficie antígenos virales específicos. La razón de esta paradójica situación no está clara, no obstante la unión del anticuerpo al antígeno en la superficie celular involucra la activación de la vía clásica del complemento. Tratamiento con neuraminidasa en las células resistentes hace esas células sensibles a lisis por AbC, lo que sugiere que los residuos de ácido siálico en la superficie celular

interfieren en la unión de los componentes del complemento. La susceptibilidad de las células infectadas por herpesvirus a la citólisis no ocurre hasta 6-15 horas posinfección. La lisis puede aparecer o hacerse evidente después de la producción de la primera progenie viral o cuando ocurre la propagación célula a célula (6-8 horas posinfección). Se ha encontrado que varios tipos de células infectadas son lisadas en presencia de suero humano inmune HSV y de complemento entre 2 y 4 horas posinfección, teniendo en cuenta que esto ocurre únicamente cuando las concentraciones del complemento y del anticuerpo son relativamente altas (21).

Lisis de las células infectadas por citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC): Las células infectadas por herpesvirus pueden ser lisadas por diferentes tipos de leucocitos en presencia de anticuerpos IgG. La reacción es mediada por los leucocitos que presentan receptores Fc para IgG. La capacidad de los leucocitos para adherirse a la célula infectada y causar citólisis no ha sido completamente dilucidada. Para ocasionar esa letalidad se requiere de la temperatura biológica, energía metabólica celular aerobia y anaerobia, calcio extracelular y magnesio y una modulación coordinada en la superficie celular por microfilamentos y microtubulos. Enzimas de la superficie del linfocito, quizá serina esterases, pueden participar como procesos de secreción pero es probable que no estén involucradas en el evento letal. Algunas prostaglandinas, como la PGE2 suprimen ADCC disminuyendo el número de leucocitos que atacan la célula infectada por HSV. Los leucocitos efectores de la respuesta ADCC-HSV son de tres tipos, así: 1) linfocitos relativamente no adherentes que poseen en la superficie receptores Fc y antígenos de superficie para células T, carentes de inmunoglobulinas en la superficie y receptores C3, que puedan formar rosetas con eritrocitos de carnero, refiriéndose a esas células como las **células K** (killer), 2) **macrófagos** y 3) **leucocitos polimorfonucleares (PMLs)**. Las células K humanas son

las mediadoras de citólisis más rápidas, requieren de pequeñas cantidades de IgG para causar daño, y no constituyen un gran número de células efectoras por unidad de volumen de sangre, a diferencia de los otros tipos celulares. La ADCC, mediada por células K y anticuerpos IgG, reconoce la nueva síntesis de antígenos virales en la superficie de las células infectadas dentro de las 2 primeras horas posinfección y causa daño celular durante la siguiente hora, lo que sugiere que este mecanismo previene la transmisión viral de célula a célula. No obstante este mecanismo puede inhibirse in vivo debido a la alta concentración de IgG en suero o en fluido extracelular. En contraste ADCC contra células infectadas con herpesvirus, ocurre realmente con suero de donadores inmunes con una alta concentración de IgG. Otros trabajos indican que ADCC se ha demostrado con antisueros de glicoproteínas virales individuales (21).

Lisis de células infectadas por otros mecanismos mediados por células: Otros mecanismos citotóxicos mediados por células incluyen las células T citotóxicas, interferón, células NK y el Factor de necrosis tumoral, entre otros.

Las células T citotóxicas se unen a la célula infectada al reconocer el antígeno y los determinantes del MHC de clase I. Las células NK desempeñan un papel lítico preferencial de blancos infectados con citomegalovirus humano in vivo. El Interferón (IFN) se libera a partir de muchos tipos celulares en respuesta a infecciones víricas. El IFN gama se libera como una linfocina a partir de las células T activadas, aunque en algunas circunstancias también parecen secretarlo los macrófagos. Los efectos antivíricos del IFN se ejercen a través de diversas vías, a saber:

1. Mayor expresión de las glicoproteínas del MHC clases I y II, lo que facilita el reconocimiento de los antígenos víricos por parte del sistema inmunitario.

2. Activación de las células con capacidad de destruir blancos infectados por virus, lo que incluye las células NK, los macrófagos y la interleucina-6 (IL-6) que estimula a las células B.

3. Inhibición directa de la replicación viral.

Diversos mecanismos contribuyen a esta tercera vía. El IFN liberado, se une a los receptores sobre las células vecinas e induce la síntesis de las proteínas antivíricas, a saber: una proteincinasa y una 2',5'-adenilsintetasa, ambas activadas por el RNA de doble cadena que se produce en el metabolismo. La cinasa inactiva es una enzima necesaria para la unión de los ribosomas, y la sintetasa cataliza una cascada enzimática que da lugar a la división del RNA. Estos y otros mecanismos ocasionan una inhibición de la síntesis de proteínas, con una cierta selectividad hacia las víricas. No obstante esa selectividad no es absoluta, lo que puede explicar la capacidad del IFN para inhibir el crecimiento celular (incluida una cierta actividad antitumoral), y para disminuir las respuestas mediadas por las células, hecho que se observa precozmente en las infecciones víricas. Existen también publicaciones en el sentido de que los IFN pueden inhibir otros procesos virales, como la penetración en las células, la exposición del ácido nucleico vírico y el brote en las células infectadas (94).

2. MECANISMOS NO LITICOS.

Estos mecanismos involucran la mediación de factores humorales, como son los anticuerpos del tipo IgG no específicos e interferón. Originalmente se creyó que el anticuerpo contra herpesvirus en sí, era suficiente para limitar la propagación viral in vitro; sin embargo, experimentos sugieren que esta afirmación es parcialmente incorrecta. Pavan y Ennis demostraron que en concentraciones adecuadas los anticuerpos neutralizantes son capaces de inhibir la formación de clases de HSV no

formadoras de sincitios, pero no son capaces de prevenir las clases de HSV que forman sincitios, sugiriendo que las clases de HSV, susceptibles al anticuerpo, se propagan célula a célula únicamente vía fluido extracelular y que allí puede ser neutralizado el virus. Skinner y cols también muestran que el tratamiento de células infectadas con suero inmune inactivado por calor durante 20 minutos, 6-8 horas después de la infección, causa una transitoria pero significativa inhibición del virus extracelular.

En ninguno de estos reportes el tratamiento con anticuerpos fue tóxico para la célula. Tempranamente, cultivos infectados con herpesvirus adquieren receptor Fc en la superficie. Estos receptores pueden ayudar a la replicación viral por unión con IgG "normal", de tal forma que se impidan estéricamente mecanismos citolíticos mediados por anticuerpos como AbC y ADCC. Realmente la lisis por AbC y ADCC ocurre óptimamente en altas concentraciones de IgG. Pero altas concentraciones de IgG no inmune inhiben el crecimiento viral sin causar lisis celular. Estos resultados sugieren un posible papel de los receptores Fc y la IgG no específica o natural, en la limitación de severas infecciones herpéticas primarias o quizá el mantenimiento de la latencia viral. Bajo ciertas condiciones, varias clases de leucocitos ejercen un efecto antiviral por mecanismos aparentemente no líticos. Estudios indican que los macrófagos tienen la capacidad de lisar células infectadas por efecto del interferón. Todos los resultados indican que mecanismos específicos y no específicos, son capaces de destruir células infectadas por herpesvirus o que interfieren con la replicación viral a través de mecanismos no líticos. Se cree que esos mecanismos actúan sinérgicamente *in vivo*. Todo esto indica que gran número de posibles mecanismos efectores, tales como las reacciones específicas de lisis por AbC y ADCC y las no específicas que puedan involucrar la interrupción de canales intercelulares por estimulación de leucocitos y la

lisis de células infectadas y no infectadas por linfocitos citotóxicos del tipo NK. También están presentes el interferón gama y linfotoxinas quienes ejercen una influencia supresiva en la replicación viral. El anticuerpo IgG puede también modular la propagación viral de ciertas clases de HSV que no forman sincitios (21).

V. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Muchos ensayos de laboratorio son útiles para el diagnóstico o confirmación de las infecciones por herpesvirus. El mejor método para este propósito es el aislamiento del virus por cultivos tisulares, que usualmente tarda de 1-4 días. Las técnicas para el diagnóstico de infecciones con herpesvirus, que son más rápidas que los métodos de cultivo, incluyen el uso de métodos no inmunológicos como la microscopia electrónica y la citología, o métodos inmunológicos para la detección de antígenos virales en células y para la detección de anticuerpos totales o tipo específicos, tales como la inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis (RIA) y análisis inmunoenzimáticos (ELISA) (21).

A. Métodos no Inmunológicos

Entre los métodos no inmunológicos se encuentran la microscopia electrónica directa y el examen citológico de la base de las lesiones teñidas con Wright, Giemsa o con tinción de Papanicolaou, que demostrarán las células gigantes multinucleadas o las inclusiones intranucleares y citoplasmáticas, características de las infecciones por herpesvirus. Estas técnicas citológicas suelen ser útiles como método rápido de confirmación diagnóstica. Las limitaciones de este método son que no distingue entre infecciones por HSV y por VZV y que su sensibilidad es sólo del 60%, en comparación con el aislamiento del virus por cultivos tisulares (95,96).

B. Métodos Inmunológicos

1. Inmunofluorescencia directa o indirecta: estos métodos pueden emplearse para la detección rápida de antígenos víricos en células obtenidas directamente del paciente, y se han mostrado especialmente efectivos en el diagnóstico de las infecciones por

herpesvirus. La detección por inmunofluorescencia indirecta de los antígenos en las células infectadas con VZV, ofrece ventajas sobre los otros ensayos debido a que pueden ser medidas las tres clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, que se han visto aumentadas durante la infección por VZV (97). La detección se hace más tempranamente que con otros ensayos y la IgG persiste por largo período. Sin embargo, en infecciones con CMV este método muestra un gran número de falsos positivos con VZV, EBV y Factor Reumatoide (97).

2. Anticuerpos Neutralizantes: El método que parece tener un gran potencial para la medición in vivo, es la respuesta de anticuerpos neutralizantes. En la infección con VZV, los anticuerpos neutralizantes en el suero humano sufren un notable incremento del título subsiguiente a la infección primaria. La respuesta neutralizante puede ser demostrada en el suero, en presencia o ausencia de complemento. Este puede aumentar la actividad neutralizante de la IgG más que la de la IgM, y para la clase tardía de inmunoglobulinas el requerimiento del complemento es relacionado con el curso clínico de la infección. En la fase temprana de la enfermedad, el complemento puede aumentar la respuesta de la IgM, mientras que en la fase tardía, la IgM en el suero, suele tener disminución del complemento disminuyendo la neutralización. En el caso de la IgG, el efecto del complemento en la neutralización, no parece tener relación con el curso clínico de la infección y no distingue entre infección reciente o infección remota. La actividad neutralizante de la IgG puede ser demostrada en pacientes recuperados de la infección por varicela o zoster, en contraste la IgM sólo puede ser demostrada durante la infección. En el ensayo de neutralización reaccionan dos componentes de la IgG, uno es la subclase IgG "lenta" y la otra es la fracción IgG "rápida". La subclase IgG "lenta" está presente en ambas infecciones varicela y zoster, y la subclase IgG "rápida", sólo es demostrada durante la infección con zoster. Los títulos de los anticuerpos

neutralizantes, particularmente cuando se adiciona complemento, son generalmente más altos que los títulos de fijación de complemento del mismo suero y permanecen positivos por un largo período durante la infección. La neutralización en sí, no es tan sensible como la técnica de inmunofluorescencia pero presenta una gran especificidad. Para infecciones con CMV no se ha usado debido a la alta relación virión no infeccioso/infeccioso, en la preparación del virus; la dificultad en obtener cantidades reproducibles de virus infeccioso en el inóculo y la heterogeneidad antigénica de las cadenas del CMV (21).

3. Fijación del complemento: Los títulos de anticuerpos contra herpesvirus también pueden ser medidos con ensayos de fijación del complemento. Este método mide únicamente IgG y no es capaz de diferenciar entre una infección primaria o recurrente como lo hace el ensayo de neutralización. Los títulos comunmente se negativizan 1-2 años después de la infección primaria. La aparición de anticuerpos fijadores de complemento es más lenta que la de los anticuerpos por inmunofluorescencia (98).

4. Método inmunoenzimático (ELISA):

Este método puede ser usado en estudios epidemiológicos directos dirigidos a describir la presencia de anticuerpos totales o tipo específicos contra los virus en diferentes grupos de edad y en varios tipos de población. También son usados para diagnóstico de la infección por demostración de la seroconversión o por elevación de los anticuerpos al cuádruplo o más, al comparar el suero de fase aguda, con el de la convalecencia (99).

Se puede utilizar la inmunofluorescencia directa de las células de la base de las lesiones o la identificación de antígenos virales por métodos como la inmunoperoxidasa. Las pruebas serológicas más usadas, basadas en la respuesta del huésped, son la identificación de anticuerpos inmunofluorescentes contra los antígenos de membrana, la hemaglutinación por adherencia inmunitaria o el análisis de inmunoadsorción con

enzimas (ELISA) siendo este último uno de los más sensibles. Recientemente, la utilización de técnicas de biología molecular ha permitido el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, que consisten principalmente en la identificación de secuencias del DNA viral con sondas específicas. Actualmente se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación e identificación de muchos microorganismos incluyendo los herpesvirus directamente de muestras clínicas (100).

VI. MATERIALES Y METODOS

A. SUEROS:

El proyecto se llevó a cabo con 44 sueros de adultos sanos de 18 a 65 años de edad (donadores de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez) y con sueros de 26 pacientes con nefropatías diversas de la misma institución.

B. METODOLOGIA:

Se usaron estuches comerciales de la casa Hoescht-Behring para la detección de anticuerpos isotipo IgG por el método de análisis inmunoenzimático (ELISA) contra Herpesvirus Simple tipo I y II, Citomegalovirus y Varicela-Zoster.

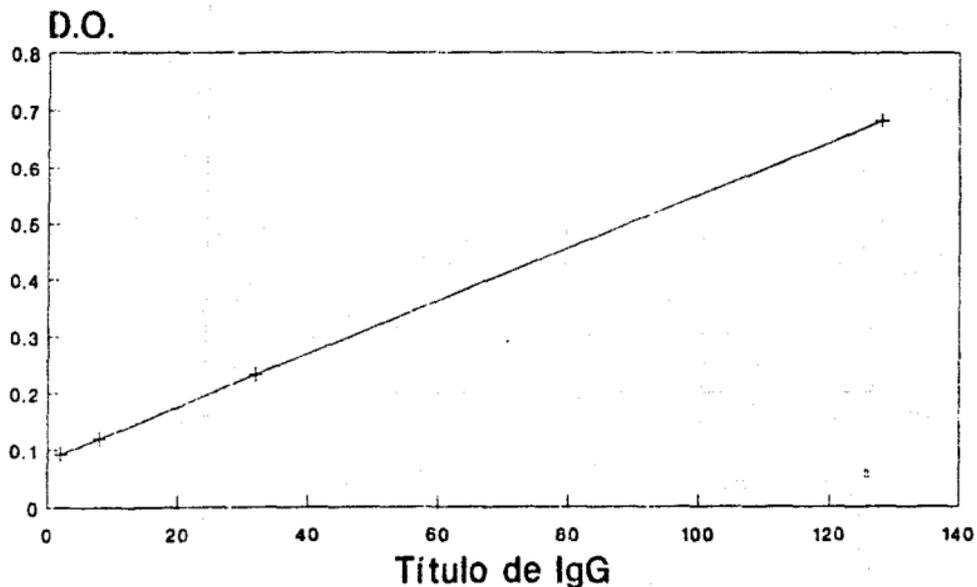
El método inmunoenzimático usado fue el indirecto o en sandwich basado en la unión del anticuerpo isotipo IgG presente en el suero problema con su antígeno específico que se encuentra unido a la placa de poliestireno (fase sólida) formando un complejo que reacciona con el conjugado enzimático que está compuesto por un anti-IgG unido a la enzima fosfatasa alcalina. Esta reacción se hace evidente por la adición del sustrato para-nitrofenilfosfato dando un color amarillo verdoso que se mide fotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos de tipo IgG presentes en la muestra.

Las muestras se diluyeron previamente 1:11 con amortiguador y se colocaron en la placa de poliestireno por duplicado, al igual que el control negativo. También se colocó cada muestra con antígeno y sin antígeno, se incubó y se lavó; posteriormente se le adicionó el conjugado, se incubó y se lavó y finalmente se le adicionó el sustrato, se incubó y se paró la reacción. El procedimiento anterior se hizo conjuntamente con el suero control positivo a diferentes diluciones (1:40, 1:160, 1:640, 1:2560) para la

obtención de la curva de calibración en la cual se interpolaron las densidades ópticas obtenidas en las diferentes muestras para obtener el resultado en títulos de anticuerpo IgG presentes en la muestra. Para un resultado más exacto se diseñó un programa en Basic, aplicando la fórmula $y = mx + b$, donde y es igual a la densidad óptica; m es la pendiente de la recta; b es el punto de corte en el eje y y x es el valor del título de anticuerpos IgG (ver gráficas 1, 2 y 3). La evaluación de los resultados se hizo fotométricamente midiendo la diferencia de absorbancias obtenidas (antígeno menos control antígeno). Los valores de la diferencias de absorbancias mayores e iguales a 0.2 equivalen a un resultado positivo y las diferencias en las absorbancias menores o iguales a 0.2 equivalen a un resultado negativo.

Curva de Calibración

Virus Herpes Simple

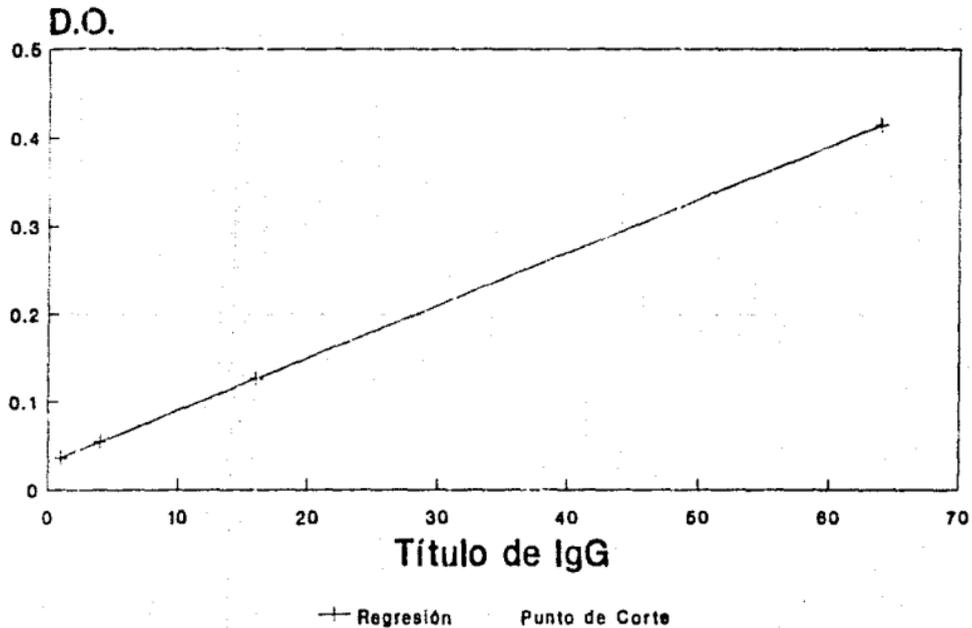


+ Regresión

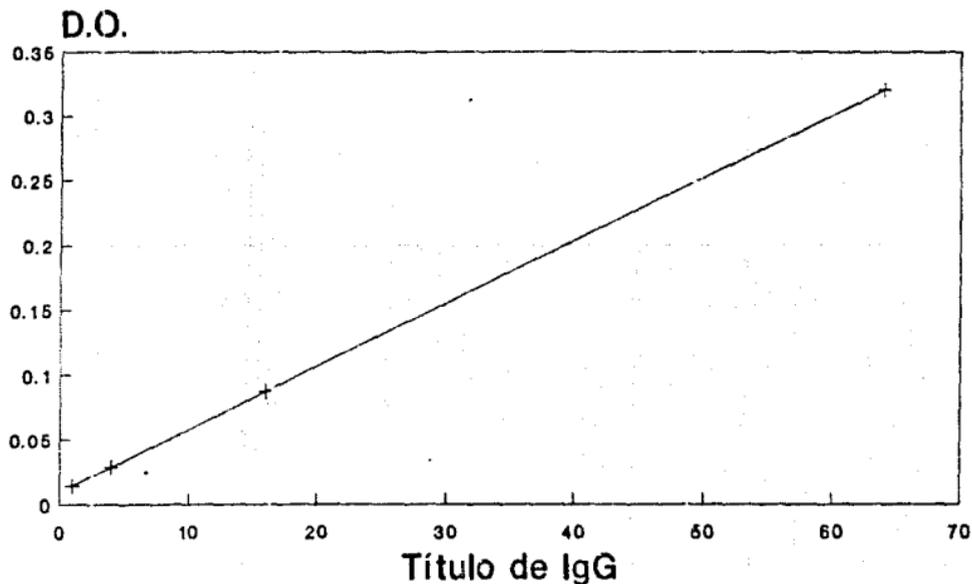
Punto de Corte

Curva de Calibración

Virus Varicela Zoster



Curva de Calibración Citomegalovirus



+ Regresión Punto de Corte

VII. RESULTADOS

En la tabla 1 se señalan los resultados obtenidos con los 3 virus en estudio. En primer lugar hay que destacar que el porcentaje de frecuencia de anticuerpos IgG contra HSV, VZV y CMV en los donadores de sangre clínicamente sanos es muy alta. En las gráficas adjuntas que representan los histogramas de frecuencias de anticuerpos IgG contra cada uno de los virus en estudio (densidad óptica y título) vs edad no hay una diferencia significativa, mostrando una línea casi recta. Los títulos de IgG contra HSV obtenidos son más altos que con los otros virus en estudio.

En la tabla 2 y 3 se muestran los resultados de la estadística descriptiva.

Tabla 1

Prevalencia de anticuerpos isotipo IgG contra HSV, VZV, CMV, en 44 Donadores de Sangre Clínicamente sanos (DSCS) y anticuerpos isotipo IgG contra CMV en 26 pacientes con Nefropatías diversas (PND)

Anticuerpos contra	# Muestras	# Positivos	Porcentaje
DSCS-HSV	44	44	100%
DSCS-VZV	44	44	100%
DSCS-CMV	44	38	88%
PND-CMV	26	25	96%

Estadística Descriptiva

Tabla 2

Anticuerpos contra	# Muestras	D O				
		Media Aritmética	S	Md	Rango desde	hasta
HSV	44	1 25	0 28	1 32	0 22	1 60
VZV	44	0 81	0 18	0 82	0 42	1 14
CMV	44	0 72	0 37	0 77	0 00	1 29

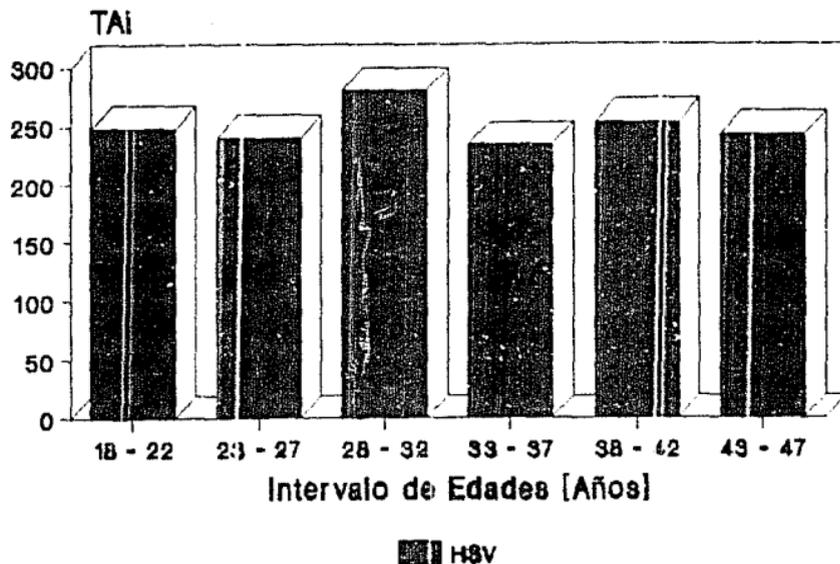
Tabla 3

Anticuerpos contra	# Muestras	Titulo				
		Media Aritmética	S	Md	Rango desde	hasta
HSV	44	250 00	60 70	264 50	30 00	324 00
VZV	44	145 75	75 56	156 50	0 00	261 00
CMV	44	129 88	30 66	132 00	66 00	184 00

Donde S = Desviación estandar.

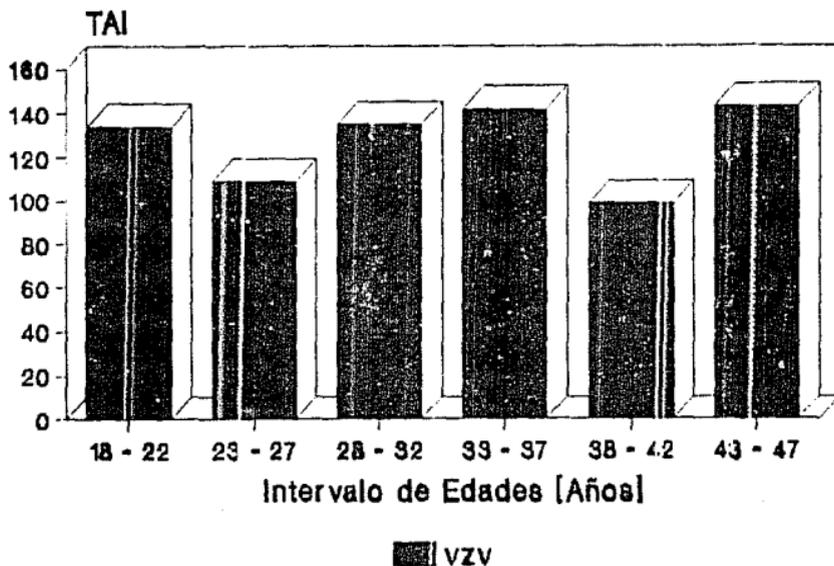
Md = Moda.

Histograma de Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra HSV vs. Edad



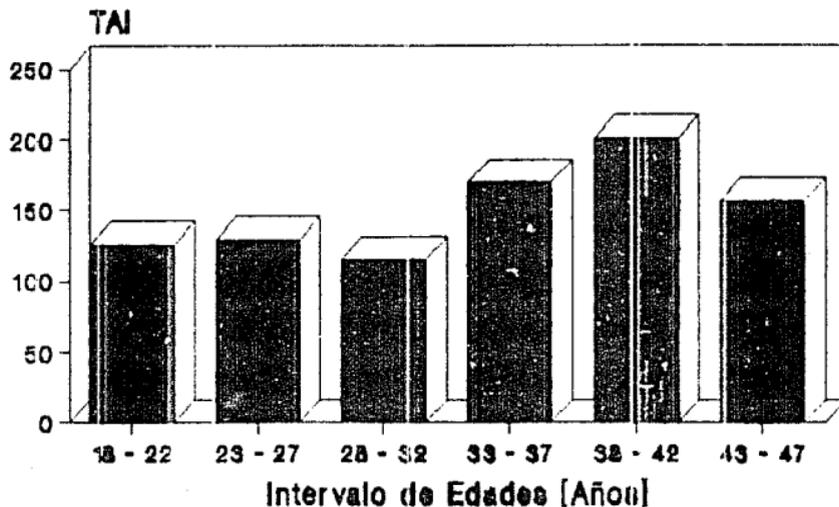
TAI (Título de Anticuerpos Isotipo IgG)

Histograma de Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra VZV vs. Edad



TAI (Título de Anticuerpos isotipo IgG)

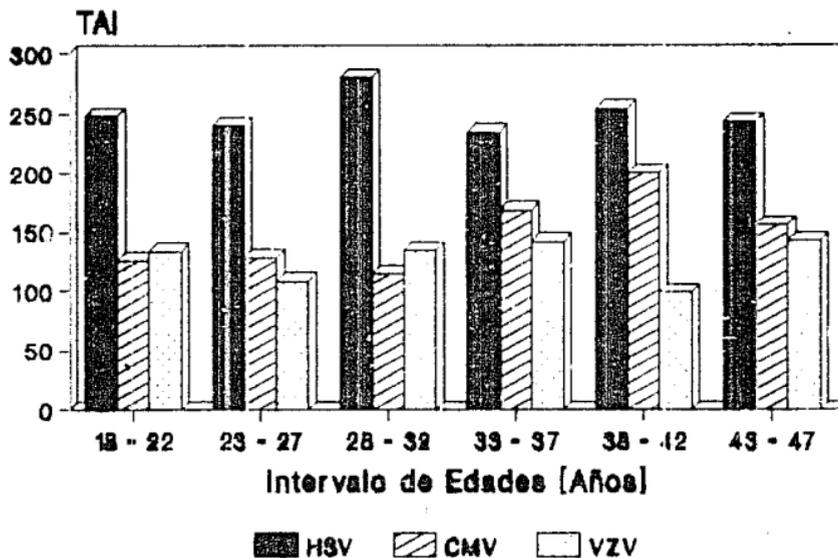
Histograma de Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra CMV vs. Edad



■ CMV

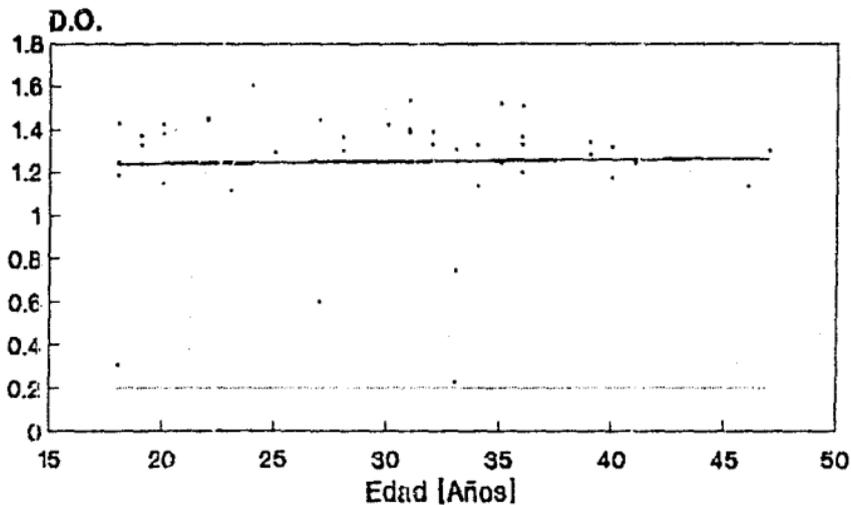
TAI (Título de Anticuerpos isotipo IgG)

Frecuencia de Anticuerpos IgG Contra HSV, CMV, VZV vs. Edad



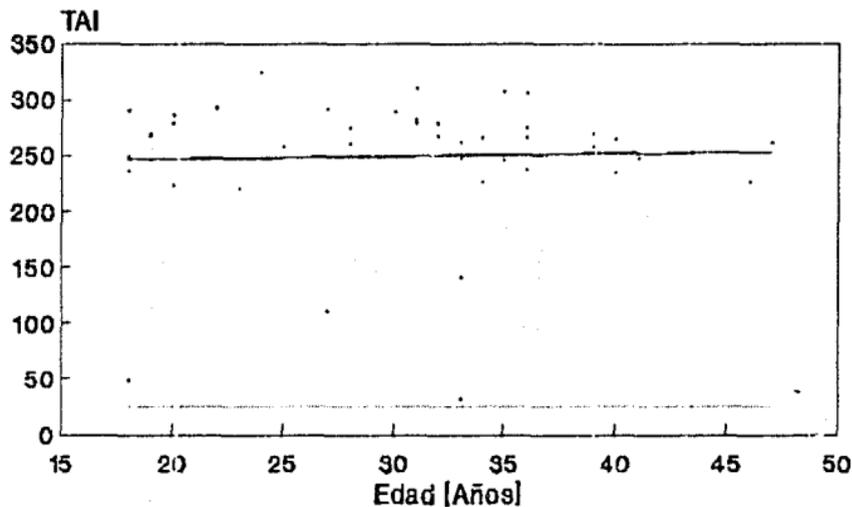
TAI (Título de Anticuerpos isotipo IgG)

Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra HSV vs. Edad



• Resultado — Regresión Punto de Corte

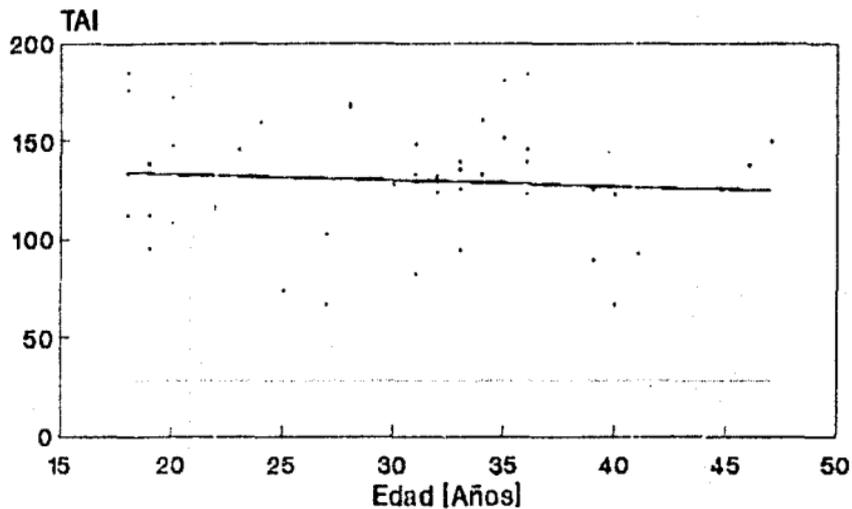
Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra HSV vs. Edad



• Resultado — Regresión Punto de Corte

TAI (Título de Anticuerpos isotipo IgG)

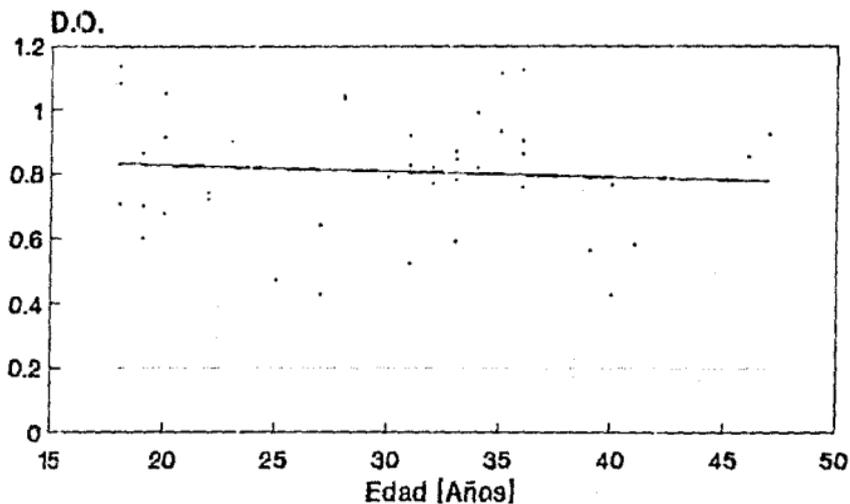
Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra VZV vs. Edad



• Resultado — Regresión - - - Punto de Corte

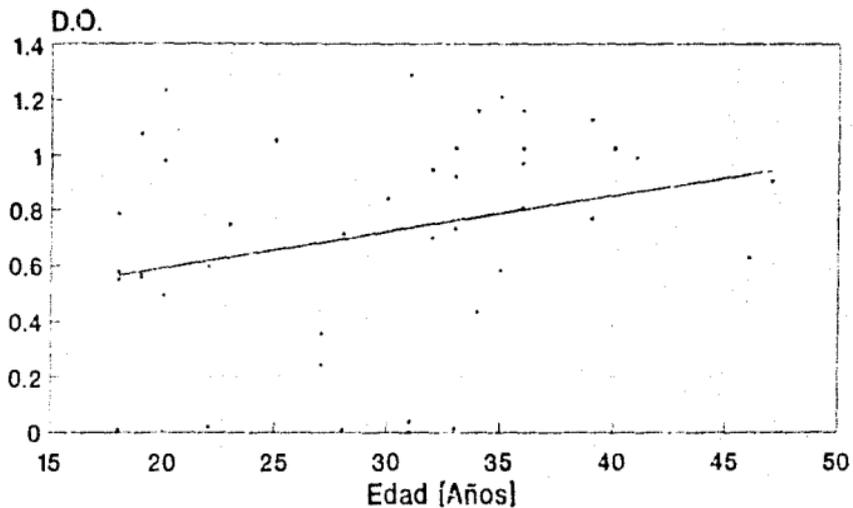
TAI (Título de Anticuerpos Isotipo IgG)

Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra VZV vs. Edad



• Resultado — Regresión - - - Punto de Corte

Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra CMV vs. Edad

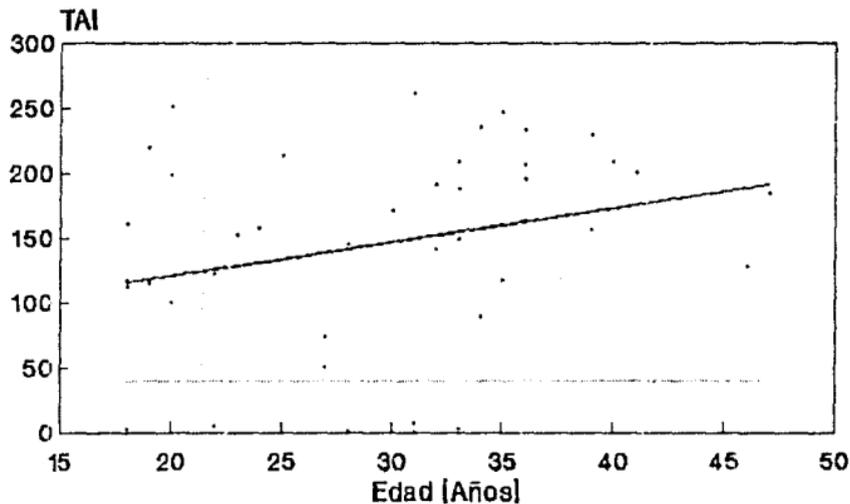


• Resultado

— Regresión

— Punto de Corte

Frecuencia de Anticuerpos Isotipo IgG contra CMV vs. Edad



• Resultado — Regresión · Punto de Corte

TAI (Titulo de Anticuerpos isotipo IgG)

VIII. DISCUSION

El objetivo fundamental de este trabajo fué el de buscar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra HSV, VZV y CMV en donadores de sangre clínicamente sanos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de la ciudad de México con el fin de establecer cifras reales de la población. Hasta este momento no se han publicado estudios epidemiológicos realizados en México que demuestren la seroprevalencia de anticuerpos contra herpesvirus razón por la cual se efectuó este trabajo.

Estudios realizados en otros países indican que las infecciones por herpesvirus son las más comunes. Aproximadamente el 70% de la población mundial es seropositiva (101). Estudios seroepidemiológicos demuestran que la infección por HSV de ambos tipos tienen alta prevalencia (102). El porcentaje de prevalencia de anticuerpos a HSV 1, es de 50% a 100% en adultos, mientras que la prevalencia a anticuerpos contra HSV 2, es generalmente baja pero con un amplio rango de 5% a 95% (102). La seropositividad se correlaciona con la edad y con un bajo estrato socio-económico. Más del 95% de adultos en una población urbana se les ha demostrado anticuerpos que indican una previa exposición e inmunidad al VZV (103). Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud revelan una amplia prevalencia de anticuerpos en adultos donadores de sangre, rangos de 40-45% en el oeste de Europa y en varios sitios de América; un 100% en Africa, Groenlandia y Asia (Krech 1973). En Seattle, una población de 60 años de edad y de clase media, estudiada por Wentworth y Alexander (1971), tuvo una positividad de anticuerpos contra CMV de 70%. En Filadelfia, fue encontrado el 50% de seropositividad en estudiantes de colegio, pero 90% de positividad en personas de más o menos 60 años. Similares resultados fueron encontrados en New York, Melbourne, Londres y Houston. En conclusión, es evidente que la infección se va acumulando lentamente durante la vida, presentando las mayores

cifras de seropositividad en la vejez. En contraste, los Asiáticos y Africanos, son infectados por el CMV a tempranas etapas de la vida. Lo mismo se concluye para las poblaciones de blancos en Birmingham, Alabama. Adultos femeninos son más positivos que adultos masculinos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la situación de México no se aleja de la observada en los otros países y sugieren que la población es infectada en etapas tempranas de la vida y que no hay diferencia entre sexos.

El fenómeno de persistencia, latencia y reactivación de los Herpesvirus en los tejidos y en la sangre, se ha encontrado frecuentemente asociado con los pacientes transplantados y pacientes con cáncer, debido al efecto de inmunosupresión (21). Las infecciones por herpesvirus en el huésped inmunocomprometido, presentan manifestaciones clínicas más graves produciendo una morbilidad y mortalidad considerable. La amplia circulación del virus en esta población trae serias implicaciones en los transplantados:

1. Un receptor seronegativo tiene una gran dificultad para encontrar un donador adecuado.
2. Un receptor seronegativo que reciba un órgano de un donador seropositivo tiene una alta probabilidad de rechazo del órgano transplantado, ya sea que el donador seropositivo tenga una reactivación de la infección y se la transmita a su receptor o porque en el órgano se encuentre el virus en su forma latente.
3. Un receptor seropositivo puede llegar a tener una reactivación de la infección pues uno de los factores principales de las infecciones recurrentes bien dilucidado es la inmunosupresión en el transplantado (1).

En este trabajo se considera necesario desarrollar métodos y criterios de evaluación que permitan conocer no sólo el estado serológico del receptor y el donador, sino también

la presencia de la infección en cualquiera de sus tres estados usando un diagnóstico rápido y veraz ya sea por aislamiento del virus, estudio de citoinclusiones, búsqueda de anticuerpos IgG o IgM o usando las nuevas metodologías de biología molecular como el PCR. También es necesario implementar de una forma correcta el uso de drogas profilácticas como por ejemplo, la administración de interferón a los pacientes seropositivos, para así evitar una posible reactivación del virus y un probable rechazo del transplante (104).

IX. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia a infecciones por HSV, VZV y CMV en la población estudiada es muy alta, lo que indica una amplia circulación del virus.
2. Las infecciones por los herpesvirus son adquiridas en etapas tempranas de la vida y no como en otros países en los que las infecciones se acumulan lentamente durante la vida presentando mayor seropositividad en la vejez.
3. En los pacientes inmunosuprimidos y en los transplantados es necesario tomar medidas preventivas contra una infección por herpesvirus o una reactivación de la infección.
4. Se requiere adoptar un programa de diagnóstico temprano de la infección en dichos pacientes.
5. Se debe hacer un estudio epidemiológico con un mayor número de muestras donde se incluyan pacientes antes del trasplante y después del trasplante con sus respectivos donadores para así saber cual es el riesgo de infección o de reactivación de la infección.
6. La transfusión de sangre y el trasplante de órganos son vías iatrogénicas para adquirir la infección, debido al fenómeno de persistencia, latencia y reactivación de los herpesvirus en los tejidos y en la sangre (105,106,107).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1** Peterslund, N.A., 1991. Herpesvirus infection: An Overview of the clinical manifestations. *Scand. J. Infect-Suppl.* 78:15-20.
- 2** Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., et al, 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:748.
- 3** Cheeseman, S.H., Rubin, R.H., Stewart, J.A., et al, 1979. Controlled clinical trial of prophylactic human-leukocyte interferon in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 300:1345-1349.
- 4** Pass, R.F., Whitley, R.J., Whelchel, J.D., et al, 1979. Identification of patients with increased risk of infection with herpes simplex virus after renal transplantation. *J. Infect. Dis.* 140:487-492.
- 5** Van den Berg, A.P., Klompmaker, I.J., Haagsma, E.B., et al, 1991. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J. Infect. Dis.* 164:265-270.
- 6** Smyth, R.L., Scott, J.P., Borysiewicz, L.K., et al, 1991. Cytomegalovirus infection in heart-lung transplant recipients: Risk factors, clinical associations, and response to treatment. *J. Infect. Dis.* 164:1045-1050.

- 7** Wilson, A., Sharp, M., Koropchak, C.M., et al, 1992. Subclinical varicella-zoster virus viremia, herpes zoster, and T lymphocyte immunity to varicella-zoster viral antigens after bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 165:119-126.
- 8** Ho, M., Suwansirikul, S., Dowling, J.N., et al, 1975. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N. Engl. Med.* 293:1109-1112.
- 9** Waterson, A.P., Wilkinson, L., 1978. An introduction to the history of virology. London: Cambridge University Press.
- 10** Reed, W., 1902. Recent researches concerning the etiology, propagation and prevention of yellow fever by the United States Army Commission. *J. Hyg.* 2:101-110.
- 11** Delbruck, M., 1940. The growth of bacteriophage and lysis of the host. *J. Gen. Physiol.* 23:643.
- 12** Stanley, W.M., 1935. Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science* 81:644.
- 13** Luria, S.E., 1950. Bacteriophage: An essay on virus reproduction. *Science* 111:507-511.
- 14** Hershey, A.D., Chase, M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39-56.

- 15** Harrison, S.C., 1991. Principles of virus structure. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., eds. *Fundamental Virology*. New York: Raven Press:37-61.
- 16** Crick, F.H.C. and Watson, J.D., 1956. Virus structure: General principles. *Nature* 177:473.
- 17** Caspar, D.L.D., Klug, A., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 27:1-24.
- 18** Strauss, S.E., et al, 1985. Herpes simplex virus infection: Biology, treatment, and prevention. *Ann. Intern. Med.* 103:404.
- 19** Morgan, J.I., 1991. Proto-oncogenes expression in the nervous system. *Discussions in neuroscience*, Vol. VII 4:11.
- 20** Enders, J.F., 1954. Cytopathology of virus infections. *Ann Rev Microbiol* 8:473-502.
- 21** Nahmias, A.J., and O'Reilly, R.J., 1982. Immunology of human infection, Part II: Viruses and Parasites: Immunodiagnosis and prevention of infections diseases. eds Robert A. Good and Stacey B. Plenum medical. New York and London:21-115.
- 22** Roizman, B., 1991. Herpesviridae: A brief introduction. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., eds. *Fundamental Virology*. New York: Raven Press:841-847.

- 23** Lonberg-Holm, K., 1981. Attachment of animal viruses to cells: An introduction. In: Lonberg-Holm, K., Philipson, L., eds.: *Virus receptors. part 2*. London: Chapman & Hall: 3-20.
- 24** Ali, M.a., Butcher, M., and Ghosh, H.P., 1987. Expression and nuclear localization of biologically active fusion glycoprotein gB of herpes simplex virus in mammalian cells using cloned DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5675-5679.
- 25** Campadelli-Fiume, G., Arsenakis, M., Farabegoli, F., and Roizman, B., 1988. Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J. Virol.* 62:159-167.
- 26** Fuller, A.O., Santos, R.E., and Spear, P.G., 1989. Neutralizing antibodies specific for glycoprotein II of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J. Virol.* 63:3435-3443.
- 27** Gompels, U., and Minson, A., 1986. The properties and sequence of glycoprotein H of herpes simplex virus type 1. *Virology* 153:230-247.
- 28** Keller, P.M., Davison, A.J., Lowe, R.S., et al, 1987. Identification and sequence of the gene encoding gpIII, a mayor glycoprotein of varicella-zoster virus. *Virology* 157:526-533.
- 29** Keay, S., and Baldwin, 1991. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human Cytomegalovirus inhibit viral fusion but no attachment. *J. Virol.* 65 (9):5124-5128.

- 30** Goldstein, J.I., Anderson, R.W., Browns, M.S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor mediated endocytosis. *Nature* 21:679-685.
- 31** Simons, K., Garoll, H., Helenius, A., 1982. How an animal virus gets into and out of its host cell. *Sci Am.* 246:58-66.
- 32** Hutchinson, L., Browne, H., Wargent, V., et al, 1992. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* 66:2240-2250.
- 33** Wiley, D.C., 1986. Viral membranes. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., eds. *Fundamental Virology*. New york: Raven Press: 45-67.
- 34** Murphy, F.A., and Kingsbury, D.W., 1991. Principles of virus structure. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., eds. *Fundamental Virology*. New York: Raven Press:30.
- 35** Suzutani, T., Lacey, S.F., Powell, K.L., Purifoy, D.J.M., and Honess, R.W., 1992. Random mutagenesis of the thymidine kinase gene of varicella-zoster virus. *J. Virol.* 66:2118-2124.
- 36** Honess, R.W., and Watson, D.H., 1977. Unity and diversity in the herpesviruses. *J. Gen. Virol.* 37:15-24.
- 37** Roizman, B., 1979. The structure and isomerization of herpes simplex viruses, *Cell* 16:481-502.

- 38** Heine, J.W., Honess, R.W., Cassai, E., Roizman, B., 1974. Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J. Virol.* 14:640-651.
- 39** Spear, P.G., Roizman, B., 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J. Virol.* 9:431-439.
- 40** Spear, P., 1980. Composition and organization of herpesvirus virions and functions of the structural proteins, in: *Oncogenic Herpesviruses* (F. Rapp, ed.), CRC Press, Boca Raton VI pp. 53-84.
- 41** Frenkel, N., Roizman, B., 1972. Separation of the herpesvirus deoxyribonucleic acid on sedimentation in alkaline gradients. *J. Virol.* 10:565-572.
- 42** Cohen, G.H., Ponce de Leon, M., Deggelmann, H., Lawrence, W.C., Vernon, S.K., Eisenberg, R.J., 1980. Structural analysis of the capsid polypeptides of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Virol.* 34:521-531.
- 43** Schrag, J.D. Prasad, B.V.V., Rixon, F.J., Chiu, W., 1989. Three dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56:651-660.
- 44** Hirsch, M.S., Zisman, B., Allison, A.C., 1970. Macrophages and age-dependent resistance to herpes simplex virus in mice. *J. Immunol.* 104:1160.

45 Notkins, A.L., 1975. Interferon as a mediator of cellular immunity in viral infections. In Notkins, A.L., ed. *Viral immunology and immunopathology*. New York: Academic Press:149.

46 Lopez, C., 1981. Resistance to herpes simplex virus-type 1 (HSV-1). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 92:15.

47 Bastian, F.O., Rabson, A.S., Yee, C.L., et al, 1972. Herpesvirus hominis: Isolation from human trigeminal ganglion. *Science* 178:306.

48 Baringer, J.R., Swoveland, P., 1973. Recovery of herpes simplex virus from human trigeminal ganglions. *New Engl. J. Med.* 178:306.

49 Stevens, J.G., Wagner, E.K., Dovi-Rao, G.B., et al, 1987. RNA complementary to a latency and gene in RNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 236:1056.

50 Openshaw, H., Sekizawa, T., Wohlenberg, C., et al, 1981. The role of immunity in latency and reactivation of herpes simplex viruses. In: Nahmias, A.J., Dowdle, W.R., Schinazi, R.F., eds. *The human herpesviruses: An interdisciplinary approach*. New York: Elsevier Science Publishing:289.

51 Spear, P., 1986. Infections with herpes simplex viruses. *N. Engl. J. Med.* 314:686, 749.

- 52** Hutchinso., L., Browne, H., Wargent, V., et al, 1992. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* 66:2240-2250.
- 53** Sawyer, M.H., Ostrove, J.M., Felser, J.M., et al., 1986. Mapping of the varicella-zoster virus deoxypyrimidine kinase gene and preliminary identification of its transcript. *Virology* 149:1-9.
- 54** Achong, B.C., Meurisse, E.V., 1968. Observations on the structure and replication of varicella virus cultivated human amnion cells. *J. Gen. Virol.* 3:305.
- 55** Almeida, J.D., Howatson, A.F., Williams, M.G., 1962. Morphology of varicella (chickenpox) virus. *Virology* 16:353.
- 56** Tournier, P., Cathala, F., Bernhard, W., 1957. Ultrastructure et developpement intracellulaire du virus de la varicelle. *Observe ou microscope electronique Presse Med.* 65:1229.
- 57** Hope-Simpson, R.E., 1965. The nature of herpes zoster: A long-term study and a new hypothesis. *Proc. R. Soc. Med.* 58:9.
- 58** Asano, Y., Itakura, N., Hiroishi, Y., et al, 1985. Viremia is present in incubation period in nonimmunocompromised children with varicella. *J. Pediatr.* 106:69-71.

- 59** Whytley, R.J., 1984. Varicella-zoster infections. In: Galasso G. Merigan, T., Buchanan, R. eds. Antiviral agents and viral infections of man. New York: Raven Press:517-541.
- 60** Feldman, S., Hunghe, W.T., Daniel, C.B., 1975. Varicella in children with cancer; seventy-seven cases. *Pediatrics* 56:388-397.
- 61** Preblud, S.R., 1986. Varicella: Complications and costs. *Pediatrics* 78:722-735.
- 62** Geelen, J.M.L.C., Waling, C., Wertheim, P., van der Noordaa, J., 1978. Human cytomegalovirus DNA. I. Molecular weight and infectivity. *J. Virol.* 26:813-816.
- 63** DeMarchi, J.M., Blankship, M.L., Brown, G.D., Kaplan, A.S., 1978. Size and complexity of human cytomegalovirus DNA. *Virology* 89:643-646.
- 64** Kilpatrick, B.A., Huang, E-S, 1977. Human cytomegalovirus genome: partial desnuration map and organization of genome sequences. *J. Virol.* 24:261-276.
- 65** Lakeman, A.D., Osborn, J.E., 1979. Size of infectious DNA from human and murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 30:414-416.
- 66** Horwitz, C.A., et al, 1986. Clinical and laboratory evaluation of cytomegalovirus-induced mononucleosis in previously healthy patients. *Medicine* 65:124.
- 67** Ho, M., 1982. Cytomegalovirus: Biology and infection. New York: Plenum:309.

- 68** Schooley, R.E., et al, 1983. Association of herpesvirus infections with T-lymphocyte subset alterations, glomerulopathy, and opportunistic infections after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 316:1366.
- 69** Drew, W.L., 1988. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 158:449-456.
- 70** Nahmias, A.J., and Ashman, R.B., 1978. The immunology of primary and recurrent herpesvirus infection-An overview, in *Oncogenesis and herpesviruses III* (G. deThé and F. Rapp, eds), pp. 659-674, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- 71** Ching, C., and Lopez, C., 1989. Natural killing of herpes simplex virus infected target cells: normal human responses and influence of antiviral antibody. *Infect. Immun.* 26: 49-56.
- 72** Ashe, W.K., and Notkins, A.L., 1967. Kinetics of sensitization of herpes simplex virus and its relationship to the reduction in the neutralization rate constant. *Virology* 33:613-617.
- 73** Daniels, C.A., Borsos, T., Rapp, H.J., Snyderman, R., Notkins, A.L., 1970. Neutralization of sensitized virus by purified components of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65:528-535.

- 74** Ashe, W.K., Mage, R., Mage, M., and Notkins, A.L., 1968. Neutralization and sensitization of herpes simplex virus with antibody fragments from rabbits of different allotypes. *J. Immunol.* 101:500-504.
- 75** Douglas, R.G., Jr., and Couch, R.B., 1970. A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in human. *J. Immunol.* 104:289-295.
- 76** Zaia, J. A., Leary, P.L., Levin, M.J., 1978. Specificity of the blastogenic response of human mononuclear cells to herpesvirus antigens. *Infect. Immun.* 20:646-651.
- 77** Whitton, J.L., Oldstone, M.B.A., 1990. Virus-Induced Immune response interactions: Principles of immunity and immunopathology. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., et al, eds. *Virology*, 2nd ed. New York: Raven Press:369-381.
- 78** Lücke, E., 1991. The pathogenesis of genital herpes simplex virus infection. *Scand. J. Infect-Suppl.* 78:7-14.
- 79** Lucin, P., Pavic, I., Polic, B., Jonjic, Stipan, and Koszinowski, V.H., 1992. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.* 66:1977-1984.
- 80** Corey, L., Reeves, W.C., and Holmes, K.K., 1978. Cellular immune responses in genital herpes simplex infection. *N. Engl. J. Med.* 299:986-991.

- 81** Rasmussen, L.E., and Merigan, T.C., 1978. Role of T lymphocytes in cellular immune responses during herpes simplex virus infection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3957-3961.
- 82** O'Reilly, R.J., Chibbaro, A., Anger, E., and Lopez, C., 1977. Cell-mediated immune responses in patients with recurrent herpes simplex virus infections. II. Infection-associated deficiency of lymphokine production in patients with recurrent herpes labialis or herpes proenitalis. *J. Immunol.* 118:1095-1102.
- 83** Rosenberg, G.L., Snyderman, R., and Notkins, A.L., 1974. Production of chemotactic factor and lymphotoxin by human leukocytes stimulated with herpes simplex virus. *Infect. Immun.* 10:111-115.
- 84** Wilton, J.M.A., Ivanyi, L., and Lehner, T., 1972. Cell-mediated immunity in herpesvirus hominis infections. *Br. Med. J.* 1:723-726.
- 85** Notkins, A.L., 1974. Immune mechanisms by which the spread of viral infections is stopped. *Cell Immunol.* 11:478-483.
- 86** Bauche, R.B., and Spear, P.G., 1979. Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. V. Identification of an Fe-binding glycoprotein. *J. Virol.* 32:779-789.
- 87** Mills, B.J. and Cooper, N.R., 1978. Antibody-independent neutralization of vesicular stomatitis virus by human complement. I. Complement requirements. *J. Immunol.* 121:1549-1557.

- 88** Brown, E.W., Burdash, N.M., Manos, J.P., and Duncan, R.C., 1977. MIF-like activity in nonstimulated and virus-infected cell cultures (abstract). Annual Meeting of the American Society for Microbiology, E185, p.111.
- 89** Rudneva, A., Korabelhikora, N.I., Germanov, A.B., et al, 1972. Studies of interferogenic activity of herpes simplex virus. Arch. Virusforsch. 37:1-5.
- 90** Valle, M.J., Jordan, G.W., Haahr, S., and Merigan, T.C., 1975. Characteristics of immune interferon produced by human lymphocyte cultures compared to other human interferon. J. Immunol. 115:230-233.
- 91** Piontek, G.E., Weltzin, R., and Tompkins, W.A.F., 1980. Enhanced cytotoxicity of mouse natural killer cells for vaccinia and herpes virus-infected targets. J. Reticuloendothel. Soc. 27:175-188.
- 92** Flanagan, J.F., 1966. Hydrolytic enzymes in KB cells infected with poliovirus and herpes simplex virus. J. Bacteriol. 91:789-797.
- 93** Brier, A.M., Snyderman, R., Mergenhagen, S.E., and Notkins, A.L., 1970. Inflammation and herpes simplex virus: Release of a chemotaxis generating factor from infected cells. Science 170:1104-1106.
- 94** Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 1991. Inmunidad frente a los virus. Inmunología. 2º eds. Ed Salvat, pp 16.1-16.7.

- 95** Nahmias, A.J., and Roizman, B., 1973. Herpes simplex viruses. *N. Engl. J. Med.* 289:667-674; 719-725.
- 96** Stewart, J., and Nahmias, A., 1981. Laboratory diagnosis of herpes simplex viruses, in laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases, A.P.H.A. Washington, D.C.
- 97** Williams, V., Gershon, A., and Brunell, P.A., 1974. Serologic response to varicella zoster membrane antigens measured by indirect immunofluorescence. *J. Infect. Dis.* 130(6): 669-672.
- 98** Brunell, P.A., and Casey, H.L., 1964. A crude tissue culture antigen for the protection of varicella-zoster complement fixing antibody. *Public Health Rep.* 79:839-842.
- 99** Leonard, L.L., Schmidt, N. J., and Lenette, E. H, 1970. Demonstration of viral antibody activity in two immunoglobulin G subclasses in patients with varicella-zoster virus infection, *J. Immunol.* 104:23-27.
- 100** Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Hoguchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with the thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- 101** Whytley, R.J., 1985. Epidemiology of herpes simplex virus, p.1-44. In B. Roizman (ed.), *The herpesvirus*. Vol. 3. Plenum Press, New York.

DATA THIS NO BOOK
SERIALS ACQUISITION

102 Nahmias, A.J., Keyserling, H., Lee, F.K., 1989. Herpes simplex virus 1 and 2. In: Evans, A.S., ed. *Viral infections of humans. Epidemiology and control*; New York and London: Plenum. 393-417.

103 Brunell, P.A., 1977. Protection against varicella. *Pediatrics* 59:1-2.

104 Balfour Jr., H.H., 1991. Prevention of cytomegalovirus disease in renal allograft recipients. *Scand. J. Infect. Suppl.* 78:88-93.

105 Ballard, R.A., Drew, W.L., Hufnagle, K.G., and Riedel, P.A., 1979. Acquired cytomegalovirus infection in preterm infants. *Am. J. Dis. Child.* 133:482-485.

106 Benson, J.W.T., Bodden, S.J., and Tobin, J.O'H., 1979. Cytomegalovirus and blood transfusion in neonates. *Arch. Dis. Child.* 54:538-541.

107 Simmons, R.L., Lopez, C., et al., 1974. Cytomegalovirus: Clinical virological correlations in renal transplant recipients. *Ann. Surg.* 180:623-634.

108 Fiala, M., Payne, J.E., et al., 1975. Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression. *J. Infect. Dis.* 132:421-423.