

11234

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DETECCIÓN VIRAL POR
INMUNOFLUORESCENCIA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :

ESPECIALISTA EN OFTAMOLOGIA

P R E S E N T A

AGUILAR CAMACHO HUGO FERNANDO

MÉXICO. 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265073



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

11234

2
29-

**DETECCION VIRAL POR
INMUNOFLUORESCENCIA
DIRECTA EN CORNEAS CON
LEUCOMAS POST-HERPETICOS**

1978

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DetECCIÓN VIRAL POR INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA EN CÓRNEAS CON LEUCOMAS POSTHERPÉTICOS.

*Hugo Aguilar, **Abelardo Rodríguez, ®Rocío Varela, ®®Manuel Ramírez, ©Armando Medina, ©©Ma. Esther Gutierrez, ¢Ramón Naranjo.

* Médico residente de III año APEC

** Jefe del servicio de patología APEC

® Becario del servicio de cornea APEC

®® Becario del servicio de cornea APEC

© Técnico histotecnólogo del laboratorio de inmunohistoquímica de la unidad de patología del Hospital General de México SS, facultad medicina UNAM.

©©Médico Adscrito de la unidad de patología del Hospital General de México SS, facultad medicina UNAM.

¢Jefe del servicio de cornea APEC

Introducción:

El HVS tipo I tiene entre 150 y 200 nm de diámetro y está compuesto de un DNA lineal que envuelve un centro proteico a su vez rodeado de un material amorfo y una bicapa lipídica.

Desde 1929 Goodpasture había postulado que el virus herpes simple se establecía en el sistema nervioso central, reactivándose para producir las recurrencias, por lo que se han hecho muchos trabajos con el propósito de descubrir esta incógnita.

El hombre es el único huésped natural para el virus herpes simple, el 90% de la población presenta anticuerpos contra dicho virus, los cuales se obtienen en la niñez durante una infección sistémica no reconocida a no ser que curse con vesículas en piel. Existen 2 tipos virológica e inmunológicamente distintos y se les denomina tipo I y tipo II. El tipo I afecta frecuentemente boca, labios y ojos y el tipo II principalmente es genital, aunque en raras ocasiones pueden invertirse los tejidos blanco. Después de la primoinfección el virus se establece por causas desconocidas en el SNC (neurotropismo), específicamente en los ganglios trigeminal y espinal en forma latente. Cuando ocurre una reactivación, éste viaja a través de los nervios sensoriales hacia los ganglios y luego al tejido blanco.

La lesión ocular primaria sucede con más frecuencia en niños y adultos jóvenes, el cuadro primario es una queratoconjuntivitis folicular con adenopatía, fiebre, malestar, irritación y lagrimeo unilateral leve. El 50% de estos pacientes en el curso de 2 semanas inician con mayor compromiso corneal de localización exclusivamente epitelial con sensación de cuerpo extraño, fotofobia, visión borrosa y una lesión epitelial muy variada que va de puntiforme a geográfica. Si se vuelve recurrente pasan indistinguiblemente a queratitis disciforme que se inicia con una edematización epitelial tanto intra como extracelular dejando células necróticas en el lecho ulceroso que finalmente son reemplazadas por células inflamatoria y detritus. El proceso se repite luego en capa de Bowman y estroma, aunque puede llegar a todas las

capas de la córnea. En algunas ocasiones se aprecian células gigantes multinucleadas de tipo reacción a cuerpo extraño adyacentes a la membrana de descemet.

El propósito de este estudio fue el de demostrar el tiempo promedio de permanencia del virus herpes simple tipo I en el epitelio corneal después de inactivado el cuadro clínico, así como establecer patrones de conducta terapéutica tanto médico como quirúrgica.

Material y métodos:

Se trata de un estudio Prospectivo, transversal, comparativo, observacional, aleatorio, original, cerrado y de muestreo aleatorio.

Se estudiaron 50 casos problemas a compararse con un grupo control de corneas sanas.

* Criterios de Inclusión y Exclusión:

Pacientes con diagnóstico de leucoma postherpético secundario a primer cuadro o a recidiva.

Se incluyeron individuos entre 10 y 60 años de edad

Se incluyeron aquellos individuos que fueron tratados con aciclovir tópico

Se excluyeron individuos que cursaron con cuadros activos.

Se excluyeron individuos que no firmaron carta de consentimiento para el estudio.

* Fuentes y Métodos de Recolección:

Se registraron en una hoja de contabilidad por partida Independiente para cada individuo. Se consignaron en dicha hoja los resultados de inmunofluorescencia así como información general de cada paciente, número de cuadros activos, tiempo del último Cuadro Activo y Uso o no de medicamento.

Se hicieron 3 frotis (epitelio corneal) por separado, de cada ojo estudiado y una vez secos, se fijaron con un citospray, las muestras fueron conservadas a 4 grados centígrados hasta el momento de su procesamiento.

* Inmunofluorescencia:

El estudio se realizó con la técnica de inmunofluorescencia directa, dos frotis de cada caso problema se incubaron con anticuerpo primario contra HVS tipo I y se analizaron contra un testigo negativo, un testigo positivo y un control normal. El testigo negativo se obtuvo al incubar el tercero de los frotis con suero normal de conejo, el testigo positivo fue una laminilla con herpes simple labial. El control normal se obtuvo de frotis de corneas sanas.

* Factores que se tomaron en cuenta para evitar resultados "falsos positivos":

- evitar el uso de fluoresceína para valoración clínica del paciente.
- aplicador adecuado para la toma del frotis del epitelio corneal. (isopo humedecido en solución fisiológica)
- fijación inmediata del material hasta su procesamiento por inmunofluorescencia, entre 2 y 8 grados centígrados (promedio 4 grados cent.)
- realización de un frotis por laminilla.
- uso del anticuerpo a una dilución específica y no en forma pura concentrada.

- comparación del caso problema con un testigo positivo para HVS I labial.
- uso de suero normal de conejo como testigo negativo.
- frotis del epitelio corneal sano como control negativo.
- valoración inmediata de las preparaciones para evitar pérdida de la positividad de las reacciones antígeno-anticuerpo.
- revisión de las preparaciones a doble ciego.
- valoración de las preparaciones por dos observadores (patólogos) con amplia experiencia.
- * factores que se tomaron en cuenta para evitar resultados "falsos negativos"
- toma inadecuada del material de los casos problema.
- falta de fijación inmediata y desecación del material.
- mala conservación del material (temp. > 8 grados centígrados)
- falta de uso de un testigo positivo para compararlo con los casos problema.
- anticuerpo no viable por caducidad y / o mala conservación del mismo.
- valoración tardía de las preparaciones realizadas, lo que condiciona una disminución en la intensidad de la reacción Ag-Ac o pérdida de la positividad.
- valoración inadecuada por el observador (inexperiencia)

resultados:

De 50 ojos, 45 fueron positivos (90%) y 5 negativos (10%). 23 ojos pertenecieron a individuos de sexo masculino (46%) y 27 ojos a pacientes del sexo femenino (54%). 22 fueron ojos derechos (44%) y 28 fueron izquierdos (56%).

Conforme al tiempo de recurrencia se encontró que en el grupo de 0 a 6 meses 24 casos fueron positivos (48%) y 2 negativos (4%) ; de 6 a 12 meses 12 casos fueron positivos (24%) y 3 negativos (6%) ; y de mas de 12 meses 9 casos fueron positivos (18%) y ninguno negativo.

En relación con las secuelas 18 ojos tuvieron leucomas (36%) y 32 presentaron leucomas vascularizados (64%).

La toma de la muestra se realizó en 34 ojos que aún estaban con tratamiento (68%) y en 16 ojos ya sin tratamiento (32%).

Discusión:

La infección primaria del herpes simple tipo I es generalmente sistémica, con síntomas respiratorios superiores inespecíficos. Aun permanece incierto si la infección se origina de una inoculación ocular primaria o si es el resultado de una infección secundaria procedente del ganglio trigeminal. Se cree que los primeros tejidos afectados son los mucocutáneos de la boca produciendo infección de las ramas mandibular y maxilar superior, llegando así al ganglio trigeminal para posteriormente pasar centrifugamente a la rama oftálmica.

Se conoce la forma de latencia del herpes virus en los ganglios trigémino y espinal más sin embargo no se había demostrado en humanos su persistencia a nivel corneal cuando el cuadro clínicamente está inactivo. Es sabido que el virus herpes simple tipo I se replica a nivel del núcleo de las neuronas infectadas y que de ahí viajan hacia las terminales nerviosas para

ser liberados, lo cual produce las típicas vesículas en piel y mucosas ó una lesión dendrítica en la cornea durante la fase activa. Sin embargo nosotros encontramos que el virus nunca deja de liberarse en el epitelio de la cornea aun en fases cicatrizales tardias totalmente inactivas, lo cual podría explicarse en base a la presencia de terminaciones nerviosas en bowman y estroma anterior, que permanentemente estarían liberando virus hacia la membrana basal del epitelio corneal y de aquí por migración celular hacia las capas mas superficiales, además la cicatrización altera en grado variable el perfecto ordenamiento de las distintas capas de la cornea. Luego entonces si el virus permanece latente de por vida en los ganglios, entonces su liberación a nivel de los nervios de la cornea podría ser permanente (hipótesis) , lo cual explica la positividad de los casos en el 90 % de nuestro estudio y la existencia de 10 % de casos negativos podría deberse a un error en el diag. o que fuesen herpes tipo II.

Aproximadamente 6 meses después de realizada una queratoplastia penetrante, el botón corneal injertado recibe nuevos filetes nerviosos procedentes del receptor, nosotros realizamos frotis de botones corneales con mas de 6 meses de evolución y en todos los casos la inmunofluorescencia mostró positividad, incluso en una muestra de 14 años de inactividad, lo cual confirmó nuestra hipótesis anteriormente expuesta.

El 68% de nuestros casos problema aun tenían tratamiento con aciclovir tópico al momento que se tomó la muestra y sin embargo la inmunofluorescencia fue positiva, pensamos que el tratamiento tópico con aciclovir es bueno para atenuar el virus que constantemente se está liberando y así disminuir el numero de recidivas, sin embargo se ha reportado resistencia de algunas cepas a este medicamento por lo que sugerimos que periodicamente se utilice otro antiviral y que nunca se suspenda su administración aunque sea a dosis muy espaciadas.

conclusiones:

1. El HVS tipo I permanece latente en la córnea toda la vida, al igual que en el ganglio trigeminal.
2. Encontramos HVS tipo I en 90% del epitelio corneal de pacientes con leucomas postherpéticos de hasta mas de 1 año de inactivado clinicamente el cuadro, por lo tanto no consideramos un factor decisivo el tiempo de evolución de un leucoma postherpético inactivo para la realización de una qpp
3. La edad, el sexo y el ojo afectado no tuvieron variaciones con significancia estadística.
4. El 68% de los casos problema aun tenían tratamiento tópico antiviral al momento de tomar la muestra, el cual los había mantenido inactivos durante largo tiempo sin complicaciones tóxicas de importancia o que sean causa de queja por parte de los pacientes por lo que concluimos que se deben seguir manejando de este modo, esto es, a bajas dosis por largos períodos y cambiando el tipo de antiviral periodicamente para evitar resistencia.

Bibliografía:

- Biology and molecular aspects of herpes simplex and varicella zoster virus

- infections. Thomas J. Liesegang, M.D. *Ophthalmology* 1992; 99: 781-799
- Duane's *Ophthalmology* 1995
 - Immunofluorescence staining
 - Persistence of herpes simplex virus DNA in rabbit corneal cells. Cantin-E; Chen-J; Willey-DE; Taylor-JL, O'brien-WJ. *invest-Ophthalmol-Vis-Sci.* 1992 Jul; 33(8): 2470-5
 - Herpes simplex virus: Molecular Biology and the possibility of corneal latency. Stuart D. Cook, F.C. ophth., and James H. Hill, Ph.D. *Survey of ophthalmology* vol 36 num 2. sep-oct 1991
 - Herpetic Keratitis: persistence of viral particles despite topical and sistemic antiviral therapy. Report of two cases and review of the literature. Decio Brick, MD; Edmund Dunkel, Ph.D; Deborah Pavan- Langston, MD. *Arc Ophthalmology* 111 (4): 522-7 Apr 1993
 - Holbach L.M, Font RL, Naumann GOH. Herpes simplex stromal and endothelial keratitis: granulomatous cell reactions at the level of descemet's membrane, the stroma and Bowman's layer. *Ophthalmology.* 1990;97: 722.728
 - Dawson C, Togui G, Moore T.E. Jr. Structural changes in chronic herpetic keratitis. *Arch Ophthalmol.* 1969;79: 740-747
 - Rong BL, Pavan-Langston D, Weng QP, Martinez R, Cherry ;, Dunkel E. Detection of herpes simplex virus, thymidine Kinase, and latency-associated transcript gene sequences in human herpetic corneas by polymerase chain reaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:1808-1815
 - Schwab IR. Oral acyclovir in the management of herpes simplex ocular infections. *Ophthalmology.* 1988;95:423-430
 - Barney NP, Foster CS. A prospective randomized trial of oral acyclovir following penetrating keratoplasty for herpes simplex keratitis. *Cornea.* In press.
 - Kaufman He and Rayfield MA: Viral conjunctivitis and Keratitis. In Kaufman HE et al, editors: *The cornea*, New York, 1988, Churchill Livingstone.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA