

23
200

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**DIAGNOSTICO Y TIPIFICACION DEL VIRUS HERPES SIMPLE EN
BASE AL ANALISIS DE SU DNA POR ENZIMAS DE RESTRICCION**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

ERNESTO MENDEZ SALINAS

1 9 8 5



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.

CONTENIDO

	pag
ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION.	2
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	14
III. OBJETIVOS.	21
IV. HIPOTESIS.	21
V. MATERIAL Y METODOS.	22
VI. RESULTADOS.	36
VII. DISCUSION.	48
VIII. BIBLIOGRAFIA.	55

ABREVIATURAS

HSV-1	Virus Herpes Simple tipo 1
HSV-2	Virus Herpes Simple tipo 2
SNC	Sistema nervioso central
MOI	Multiplicidad de infección
ecp	efecto citopático
RIA	Radioinmunoensayo
VCM	Virus de Molusco Contagioso
MEM	Medio mínimo esencial
MEM s/s	Medio mínimo esencial sin suero
G-C	Guanina-Citosina
ufp	Unidades formadoras de placa
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
CsCl	Cloruro de Cesio

I. INTRODUCCION.

El virus Herpes Simple es uno de los agentes infecciosos más comunes que atacan a la población, provocando lesiones en piel y mucosas principalmente; de acuerdo al serotipo (tipo 1 ó tipo 2), ataca de manera predominante en algunas zonas corporales (Tabla 1). Pertenece a la Familia Herpetoviridae, a la que además, pertenecen otros virus de importancia médica como el virus Epstein-Barr responsable de la mononucleosis infecciosa y de procesos tumorales; el virus Varicela Zoster que provoca varicela con lesiones de tipo vesicular principalmente en piel, muy semejantes a las producidas por Herpes Simple; y el Citomegalovirus, responsable de muchos defectos congénitos en recién nacidos, incluyendo problemas en Sistema Nervioso Central (SNC) (31).

El virus Herpes Simple (HSV) tiene un genoma constituido por DNA de doble cadena con un peso molecular aproximado de 100 millones de daltones, que codifica por lo menos para 50 proteínas (26), de las cuales 27 son consideradas estructurales. El DNA por si mismo es infeccioso, tanto en estado nativo como desnaturalizado (33, 52).

El genoma está rodeado por algunas proteínas formando una cápside icosaédrica que mide alrededor de 100 nm de diámetro y que contiene 162 capsómeros; esta cápside está cubierta por una estructura que semeja una membrana trilaminar que contiene lípidos, poliaminas y glicoproteínas, siendo estas últimas las que determinan de manera importante la especificidad del virus. A esta estructura trilaminar se la ha denominado envoltura y parece ser la parte importante, aunque no indispensable, para que el virus infecte a la célula (33).

La entrada del virus a la célula puede darse por fusión de membranas ó por endocitosis; durante la infección se observa que ocurre transcripción del

DNA viral en etapas tempranas, aún antes de la propia duplicación del genoma, produciéndose antígenos virales llamados tempranos que pueden detectarse en la superficie de una célula infectada. Un efecto observable del virus es la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (DNA y proteínas), la cual es total a las 7 horas postinfección (24).

En cultivo de células se ha observado que la infección por herpes puede darse por fusión de dos células, una de ellas infectada con el virus; ó por simple difusión del virus de una célula a otra. Ante la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus en el medio de cultivo, el HSV provoca placas líticas que permiten su cuantificación (22). El efecto citopático que produce el herpes es variable, consiste desde el redondeamiento, redondeamiento y aglomeración hasta la fusión celular produciendo células gigantes (15), este efecto parece estar determinado por las glicoproteínas codificadas por el virus (25, 26, 32, 35).

El ensamblaje del virus ocurre en el núcleo, ocasionando la formación de cuerpos eosinófilos correspondientes al material genómico viral, ya que la cromatina de la célula se desplaza hacia la membrana nuclear. El virus adquiere la envoltura a partir de la membrana citoplásmica ó, en la mayoría de los casos, de la membrana nuclear.

El modo de transmisión del virus Herpes Simple es por contacto directo, principalmente por ruta oral o genital ya que estas son las zonas corporales más comunmente afectadas. La infección por HSV en un individuo da como resultado la lisis celular en el sitio o tejido afectado, produciéndose gran cantidad de partículas infecciosas, posteriormente, el virus se establece en estado latente. El HSV entra en el organismo a través de superficies mucocutáneas y, de ahí, empieza a colonizar los ganglios sensoriales correspondien-

tes, migrando principalmente a través de los nervios. El virus puede alcanzar otros órganos por las vías hematógica y/o linfática; cuando se implanta en cerebro produce encefalitis, lo cual es de alto riesgo en niños y en personas inmunodeprimidas. Comúnmente el virus no llega a SNC y entra en su fase latente.

TABLA 1. PROPIEDADES DEL VIRUS HERPES SIMPLE.
SITIO DE LA INFECCION Y NUMERO DE CASOS (34). *

SITIO DE INFECCION	HSV-1	HSV-2	TOTAL
I. Lesiones suaves o moderadamente severas (personas mayores de 1 año).			
A. Lesiones urogenitales			
1. Mujeres (vulva, cérvix, vagina, etc)	34	272	306
2. Hombres (pene, uretra)	6	187	193
B. Infecciones no genitales			
1. Gingivostomatitis o asintomático	131	3	134
2. Herpes labial	84	0	84
3. Queratitis y/o conjuntivitis	28	1	29
4. Dermatitis: a) Arriba de la cintura	84	3	87
b) Abajo de la cintura	4	72	76
c) Manos y brazos	13	11	24
C. Infecciones latentes			
1. Ganglios trigeminales o torácicos	21	0	21
2. Ganglio sacral	0	5	5
II. Lesiones usualmente severas a fatales (personas mayores de 1 año)			
A. Meningoencefalitis (cerebro, cordón espinal)	86	2	88
B. Esclerosis múltiple (cerebro)	0	1	1
C. Eczema herpético (piel, pulmón)	11	0	11
D. Infección generalizada (órganos viscerales)	2	1	3
III. Infecciones en recién nacidos	36	74	110
TOTALES	540	632	1172

* La tipificación se realizó por Inmunofluorescencia.

La infección primaria en la zona oral tiene un período de incubación de 3 a 12 días; la mayoría de las veces es asintomática (entre 88 y 99% de los casos) y se adquiere en la infancia; sin embargo, cuando se manifiesta, suele ser bastante severa produciendo un cuadro clásico denominado gingivostomatitis; en ocasiones se presenta también faringitis durante la infección primaria. En la primera o segunda semana de la enfermedad se desarrollan anticuerpos (36), pero éstos no aseguran una inmunidad permanente ya que, con frecuencia existen recurrencias, independientemente del nivel de anticuerpos neutralizantes contra el virus presentes en el suero (14).

El herpes labial recurrente tiene lugar en una parte considerable de la población. Las lesiones empiezan con eritema y/o pápula y rápidamente progresan

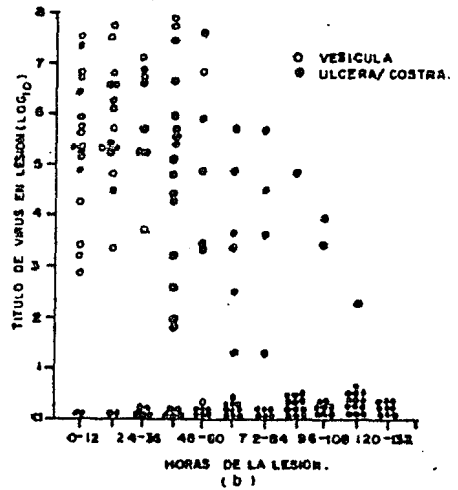
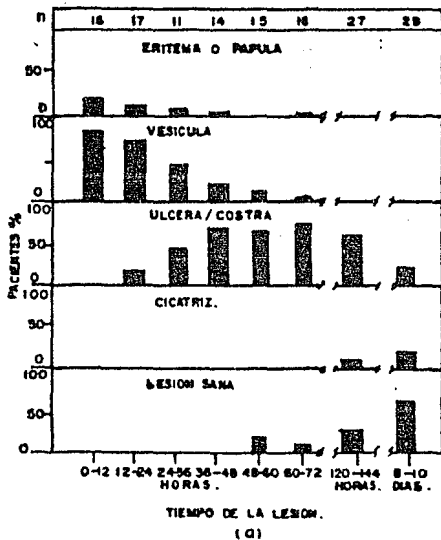


Figura 1. CURSO CLINICO Y VIROLOGICO DE HERPES LABIAL RECURRENTE. (a) FRECUENCIA DE LOS ESTADOS DE LA LESION EN N PACIENTES A DIFERENTES TIEMPOS DE APARECIDA LA LESION Y (b) CANTIDAD DE VIRUS EN LAS LESIONES EN ESTADO VESICULAR Y ÚLCERA / COSTRA. (SPRUANCE, ET. AL. 1977.)

a vesículas, usualmente en 12 horas (la vesícula es la forma característica como se presentan las infecciones por HSV en piel); éstas dan lugar posteriormente a úlceras, costras y finalmente sana la lesión (Figura 1). Este cuadro clínico comprende un periodo de 8 a 10 días (51), pero en pacientes inmunodeprimidos puede alargarse hasta 30 días ó más (57). Las lesiones características sobre membranas húmedas son las úlceras, que se forman de manera rápida y sanan gradualmente desde la periferia hacia el centro de la misma (36).

La infección genital primaria por HSV tiene un periodo de incubación de 3 a 7 días; muchas veces se adquiere en la adolescencia, cuando el individuo comienza su vida sexual, pero alcanza un máximo entre 25 y 27 años en los hombres y entre 20 y 24 años en las mujeres (4), edad que coincide con una mayor actividad sexual. La infección primaria suele ser bastante mas severa que

TABLA 2. CARACTERISTICAS DE INFECCIONES GENITALES POR HERPES SIMPLE (36).

CARACTERISTICA	PRIMARIO		RECURRENTE	
	HOMBRE n=63	MUJER n=126	HOMBRE n=218	MUJER n=144
- Síntomas prodrómicos (% pacientes)	39	68	53	43
- Dolor (% pacientes)	95	99	67	88
- Disuria (% pacientes)	44	83	9	27
- Adenopatía con dolor (% pacientes)	80	81	23	31
- Número promedio de lesiones a la aparición	15.7	15.4	7.5	4.8
- Area de la lesión (mm ²)	427	550	62.7	53.5
- Duración de la lesión (días)	16.5	19.7	10.6	9.3
- Duración de excreción del virus (días)	10.5	11.8	4.2	4.9
- Titulo pico del virus en la lesión (media geométrica log ₁₀)	--	--	4.1	2.9

las recurrencias. Se ha visto que en las mujeres, un factor importante en la recurrencia es la menstruación, mientras que en el hombre lo es el contacto

sexual (28). La Tabla 2 muestra algunas características importantes del herpes genital en infecciones primarias y recurrentes, respectivamente.

El virus Herpes Simple también causa infecciones oculares provocando lesiones en la córnea y en la conjuntiva. El periodo de incubación es de 2 a 12 días; la infección se inicia en conjuntiva, después de dos semanas, se empiezan a desarrollar lesiones en la córnea produciéndose figuras dendríticas, además, existe blefaritis con vesículas al margen del párpado. Cuando la lesión es solamente en conjuntiva, sana en dos o tres semanas. Usualmente, tanto la córnea como la conjuntiva sanan completamente (31). Aproximadamente el 25% de los pacientes con herpes ocular presentan infecciones recurrentes pero no ha sido posible aislar al virus en la etapa de latencia (31).

Las infecciones recurrentes se deben a que el HSV permanece en el organismo de manera latente, siendo ésta una característica común de todos los miembros de la Familia Herpetoviridae (31). En el estado latente, el genoma viral está integrado a la célula huésped de manera que existen, en promedio, 0.1 equivalentes de genoma viral por célula, en el caso de HSV. La infección latente parece implantarse en las neuronas de los ganglios sensoriales (28), la presencia de DNA viral en el estado latente solamente puede detectarse por técnicas de hibridización o por cultivo mixto de ganglios con células sensibles al virus.

La latencia, una vez iniciada, persiste por periodos prolongados, ó aún de por vida, en el organismo. Esto depende de muchos factores tales como el número de neuronas que se infectan de manera latente después de una infección primaria y el número de neuronas en que ocurre la reactivación durante cada recurrencia; también depende de la sobrevivencia de la neurona después de la reactivación y, de la posibilidad de establecer nuevos grupos de neuronas in-

fectadas latentemente despues de cada episodio recurrente (28). Parece ser que la respuesta inmune es el factor mas importante para mediar la transición del estado agudo al estado latente de la infección.

La reactivación del virus puede ser provocada por ciertos factores que actúan directa o indirectamente sobre el virus en estado latente; por ejemplo, algunos factores que actúan sobre la piel como la luz UV puede mediar la reactivación gracias a que favorece una síntesis incrementada de prostaglandinas, que favorecen la multiplicación viral (5). Otros factores que favorecen las recurrencias son: fiebre, infecciones de tipo bacteriano como neumonia neumococcica (36); la utilización de fármacos inmunosupresores; enfermedades crónicas como cáncer y, en general, aquellos factores que deprimen la respuesta inmunológica.

En periodos recurrentes, la mayoría de los pacientes desarrollan lesiones herpéticas, sin embargo, en algunos casos la reactivación se reduce a la excreción del virus de manera asintomática (14, 34, 37). La frecuencia del proceso de reactivación puede depender del estado general del organismo, naturaleza e intensidad de los factores inductores y, del tipo antigénico del virus latente en un ganglio particular. Ciertos estudios muestran que entre pacientes con un primer episodio de infección genital con HSV-1, solamente el 14% experimentó un periodo recurrente subsecuente, comparado con el 60% de aquellos infectados con HSV-2 (46). Se cree, aunque se carece de pruebas determinantes, que los periodos recurrentes van siendo menos severos en un paciente en la medida que transcurre el tiempo desde la infección primaria (28).

La latencia del virus Herpes Simple ha sido un factor importante para que el virus no haya podido ser erradicado debido a que puede haber reactiva-

ción y, en estado productivo, transmisión del mismo. Existen también otras causas, como la falta de un sistema preventivo adecuado; una vacuna con el virus atenuado no es recomendable ya que hay evidencias muy fuertes para atribuir al virus propiedades oncogénicas (18, 45). La carencia de un fármaco eficaz contra las infecciones herpéticas es otra de las razones por las que este virus no ha sido controlado: algunos, tienen acción contra el virus cuando se halla en estado productivo pero no se ha demostrado que alguno de ellos actúe sobre el virus latente para eliminarlo (54).

El virus Herpes Simple es de gran importancia como problema de salud, debido a que gran parte de la población padece infecciones debidas a este virus (ya sea en estado productivo ó en estado latente), como lo demuestran muchos estudios, algunos de los cuales se mencionan a continuación:

CESARIO, 1969. En una casa hogar para niños, el 32% de los niños que tenían anticuerpos contra HSV excretaban al virus periódicamente, la mayoría de manera asintomática (34).

DOUGLAS, 1970. En un estudio con adultos que presentan anticuerpos hacia HSV-1 en ausencia de lesiones clínicas, se recobró el virus a partir de secreciones orales en un 50% (14).

BARINGER, 1973. En 6 de 7 cadáveres recuperaron el virus a partir de ganglios trigeminales: de los 7 cuerpos, solamente 2 tenían historias clínicas sugestivas de herpes labial o herpes en la zona oral (2).

RAWLS, 1973. Mediante un estudio en poblaciones de Estados Unidos, Dinamarca, N. Zelanda e Israel se determinó que entre un 83 y un 100% de las distintas poblaciones presentaban anticuerpos contra HSV (tipo 1 y/o tipo 2) (45).

BARINGER, 1974. En el 40% de 60 cadáveres adultos escogidos al azar se

recobró el virus HSV-2 a partir de nervios sacrales (3).

NAHMIAS, 1976. En un estudio con mujeres mayores de 40 años se observó que el 9% de una población en Estados Unidos y el 77% de una población en Uganda presentaron anticuerpos contra HSV tipo 2 (34).

WHITLEY, 1980 y YEAGER, 1984. El porcentaje de HSV-2 aislado de niños con herpes neonatal se mantuvo entre el 56 y el 86%; en todos los casos, la infección fué provocada por la madre, que presentaba infección productiva pero subclínica en el momento del parto (37, 53).

TABLA 3. INFECCIONES CON HSV. TIPO DE VIRUS
Y NUMERO DE EPISODIOS EN EE.UU (37).

TIPO DE INFECCION	PRESENCIA Y TIPO DE HSV	EPISODIOS/ANO
- Gingivoestomatitis	98% tipo 1	500 mil
- Herpes labial recurrente	99-100% tipo 1	100 millones
- Herpes genital primario	87-93% tipo 2	60 mil-500 mil
- Herpes genital recurrente	81-100% tipo 2	2-20 millones
- Herpes ocular	97% tipo 1	300 mil
- Encefalitis herpética	97% tipo 1	1000
- Herpes neonatal	56-86% tipo 2	200-1000

En el Center for Disease Control (CDC), Estados Unidos, se ha determinado que el herpes genital es la cuarta enfermedad venérea mas común, despues de gonorrea, uretritis o vaginitis no específica y verrugas venéreas; además ciertos estudios (4, 37), demuestran que la frecuencia de infecciones por HSV ha incrementado notablemente:

- En Estados Unidos, el herpes genital incrementó de 3.4 a 29.2 casos por cien mil consultas de práctica privada en un periodo de 13 años (1966 a 1979). El

herpes oral incrementó 1.5 veces; mientras que el herpes neonatal aumentó de 0.03 a 0.12 casos por mil niños vivos de 1966-69 a 1978-81.

- En Inglaterra los casos de herpes genital aumentaron de 12.2 a 28.8 por cien mil habitantes en un periodo comprendido entre 1971 y 1978.

Las tablas 3 y 4 muestran algunos datos que, aunque no son estadísticas de nuestro país, reflejan lo grave que resulta el virus Herpes Simple como problema de salud mundial.

 TABLA 4. HERPES NEONATAL. SITIO INVOLUCRADO Y CONSECUENCIAS (37)*.

TIPO DE INFECCION	PACIENTES		CONSECUENCIAS		
	No.	%	MUERTE	SECUELAS	NORMAL
Diseminada					
Involucrando SNC	78	33	71%	15%	14%
Sin involucrar SNC	38	16	87%	3%	10%
Localizada					
En SNC	61	26	37%	51%	12%
Ojo	13	5	0	31%	69%
Piel	39	17	10%	26%	64%
Boca	4	2	0	0	100%
Asintomática	2	1	0	0	100%
Totales	235	100%	49%	25%	26%

 * Diagnóstico premortem y sin tratamiento con antivirales (En Estados Unidos).

Todos los datos mostrados anteriormente son algunos de los muchos realizados hasta la fecha en los que se observa lo importante que resulta el virus Herpes Simple desde el punto de vista epidemiológico y de salud; sin embargo, en México se carece de una metodología que permita diagnosticar al virus como agente etiológico de infecciones ulcerovesiculares de manera precisa.

El herpes genital puede confundirse clínicamente con sífilis primaria (Treponema pallidum), chancro suave (Haemophilus ducreyi) y linfogranuloma venéreo en su fase inicial (Clamidia trachomatis), debido principalmente a que todos ellos, provocan la formación de úlceras y aunque los datos clínicos ayudan al diagnóstico diferencial, frecuentemente existen confusiones o infecciones mixtas. Es importante llevar a cabo el diagnóstico diferencial ya que el tratamiento es diferente y específico para cada caso, sobre todo en la fase temprana de la infección. Recientemente se han descrito casos en los que el virus Epstein-Barr es responsable de úlceras genitales (43), y, por lo tanto es necesario considerarlo también en el diagnóstico diferencial; lo mismo ocurre con el virus de molusco contagioso (13).

Las infecciones herpéticas en la mucosa oral pueden ser confundidas con otras infecciones virales provocadas por algunos virus Coxsackie tipo A, principalmente A2-A6, A8 y A10 que producen herpangina y A10 que produce faringitis linfonodular (12); ambos cuadros son muy semejantes a la gingivoestomatitis y a las úlceras herpéticas recurrentes intraorales. En estos casos es necesario identificar al virus para el diagnóstico ya que el cuadro clínico y el curso de la infección son muy semejantes.

Un caso de infección herpética que requiere necesariamente el diagnóstico de laboratorio antes de establecer el tratamiento es el herpes ocular. Es muy común que los corticosteroides se administren localmente en infecciones bacterianas pero cuando se administran en infecciones herpéticas, éstas aumentan en severidad, ya que tales medicamentos inhiben la cicatrización de la lesión, provocando con ello que el virus siga infectando células adyacentes.

Como se mencionó anteriormente, puede haber casos asintomáticos de herpes genital en mujeres embarazadas, siendo alto el riesgo de infección del

niño al momento del parto, es pues necesario establecer un diagnóstico diferencial en tales casos para realizar una operación cesárea y evitar el contacto del niño con el virus durante el parto.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México, el diagnóstico del virus Herpes Simple se realiza de tres formas:

1. Observación de las células en la base de la lesión. Se hace un raspado de la lesión y el frotis se tiñe con Giemsa o Papanicolau para observar los cambios morfológicos de las células infectadas en la base de la lesión. Se observan cuerpos eosinófilos intranucleares debidos a la acumulación del genoma viral. Este examen resulta poco sensible y puede dar resultados falsos negativos (36).

2. Pruebas serológicas. Las mas utilizadas en el diagnóstico de HSV son: neutralización, inmunofluorescencia y ELISA. En los casos de infecciones primarias puede compararse el titulo de anticuerpos especificos entre el suero agudo y el suero convaleciente del paciente, lo cual nos permite establecer si hubo ó no infección, pero dado que hay que esperar un periodo de tiempo largo (aproximadamente 3 semanas) no resultan apropiadas para el manejo clinico del paciente (44). La serologia, no siempre es de utilidad en infecciones recurrentes, porque en muchas ocasiones no se presenta un aumento de anticuerpos ante la infección secundaria (14). Una importancia de la serologia es la detección de infecciones por distintos tipos de Herpes Simple, aunque deben considerarse cuidadosamente las reacciones cruzadas que normalmente se presentan.

3. Características clinicas de la lesión. La mayoría de las veces, el diagnóstico se efectua solamente tomando en cuenta estas características, pero muchos otros agentes infecciosos pueden producir lesiones del mismo tipo como ya se ha mencionado en párrafos anteriores.

Tomando en cuenta las diferencias en sus propiedades biológicas se han desarrollado distintos métodos de tipificación; por ejemplo, podemos distinguir los dos tipos de HSV por su sensibilidad a ciertas sustancias como la heparina (40), y la 5-(2-Bromovinil)-2-desoxiuridina (55); por la capacidad de formar placas líticas de distintos tamaños al ser cultivados en embriones de pollo; por el tipo de efecto citopático que producen en monocapas celulares; por el neurotropismo en ratones (41) y muchas otras pruebas.

Considerando sus diferencias serológicas, se han desarrollado pruebas de alta sensibilidad tales como la tinción con inmunoperoxidasa, RIA y ELISA; el problema en estos casos es la disponibilidad de reactivos biológicos altamente específicos (principalmente sueros), que resultan de alto costo y difíciles de obtener.

Otras metodologías utilizadas son la microscopía electrónica, que es de utilidad para diferenciar al HSV de Poxvirus y Enterovirus pero que en general no nos permite distinguirlo del virus Varicela Zoster; esta técnica es poco aplicada por la escasa disponibilidad de microscopios electrónicos para el diagnóstico.

Finalmente, una técnica que ha sido introducida recientemente es la detección del DNA viral, ya sea por hibridización (6, 52) o por patrones electroforéticos de los fragmentos producidos por enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen secuencias específicas en el DNA (la secuencia de reconocimiento puede ser de 4, 5 ó 6 bases). Muchas de estas enzimas cortan dentro de esa secuencia, pero existen algunas que cortan en sitios diferentes al sitio de reconocimiento. Tales enzimas se han obtenido a partir de distintos microorganismos, principalmente bacterias.

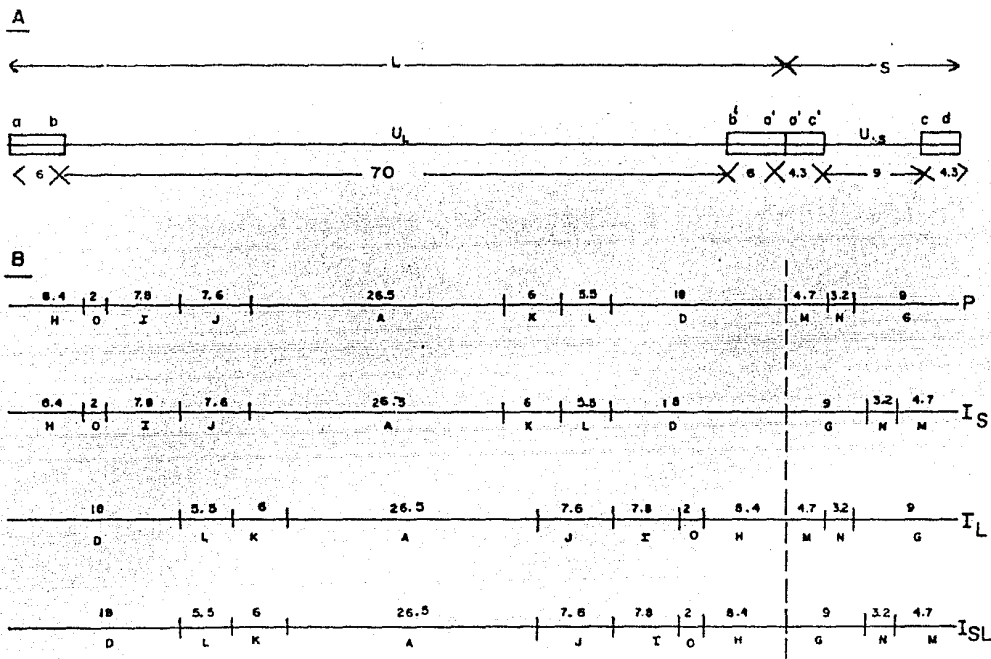


Figura 2. ESTRUCTURA DEL DNA DE HSV. (A) ARREGLO DE LA SECUENCIA DE DNA DE HSV-1. EL TAMAÑO DE LAS SECUENCIAS UNICAS (U_L Y U_S) AL IGUAL QUE LAS SECUENCIAS Ob Y CO Y b' d' Y d' c' , ESTAN DADAS COMO PESOS MOLECULARES X10⁶. EL ARREGLO Y EL TAMAÑO DE LAS SECUENCIAS SON SIMILARES PARA EL DNA DE HSV-2. (B) MAPAS DE RESTRICCIÓN EN LOS CUATRO POSIBLES ARREGLOS DEL DNA DE HSV-1. P: ARREGLO PROTOTIPO, I_S , I_L E I_{SL} CORRESPONDEN A LOS ARREGLOS "S" INVERTIDO, "L" INVERTIDO Y "SL" INVERTIDOS. (BUCHANAN, TG; ET AL. 1980)

Gracias a la utilización de las enzimas de restricción y radioisótopos, se ha determinado, mediante electroforesis, que el DNA de HSV está formado por dos segmentos (L y S), cada uno de los cuales presenta una secuencia única en la parte central, (UL y US), y secuencias repetidas en sus respectivos extremos, representados en la Figura 2 como ab, b'a', ac y c'a'. La existencia simultánea de esas secuencias da como resultado la presencia de 4 poblaciones equimolares en las que cada uno de los fragmentos repetidos se encuentran invertidos entre sí (9).

También se han determinado los sitios de corte con diferentes enzimas de restricción en cepas prototipo de HSV (tipos 1 y 2), aunque existen sitios de corte variables en distintas cepas, como lo muestran las figuras 3 y 4 (8).

La utilización de enzimas de restricción se ha aplicado en el estudio de diferentes cepas de HSV aisladas de diversos orígenes clínicos y geográficos (7, 8, 10). Estos estudios han demostrado la existencia de una enorme variabilidad de genomas virales en cuanto al número y peso molecular de los fragmentos resultantes de la digestión con dichas enzimas (7, 8, 10, 20), sin embargo se ha observado que:

- Los dos tipos de HSV pueden diferenciarse por el patrón electroforético de los fragmentos del DNA viral resultantes de la digestión con distintas enzimas de restricción (1, 7, 10, 30, 51)
- Las cepas aisladas no relacionadas son fácilmente diferenciables por el patrón de restricción que se produce al digerir con una enzima, distinguiéndose en, por lo menos, un sitio de corte (8, 20).
- Las cepas relacionadas epidemiológicamente son indistinguibles en cuanto a los fragmentos producidos por el corte con una enzima de restricción (7, 8).

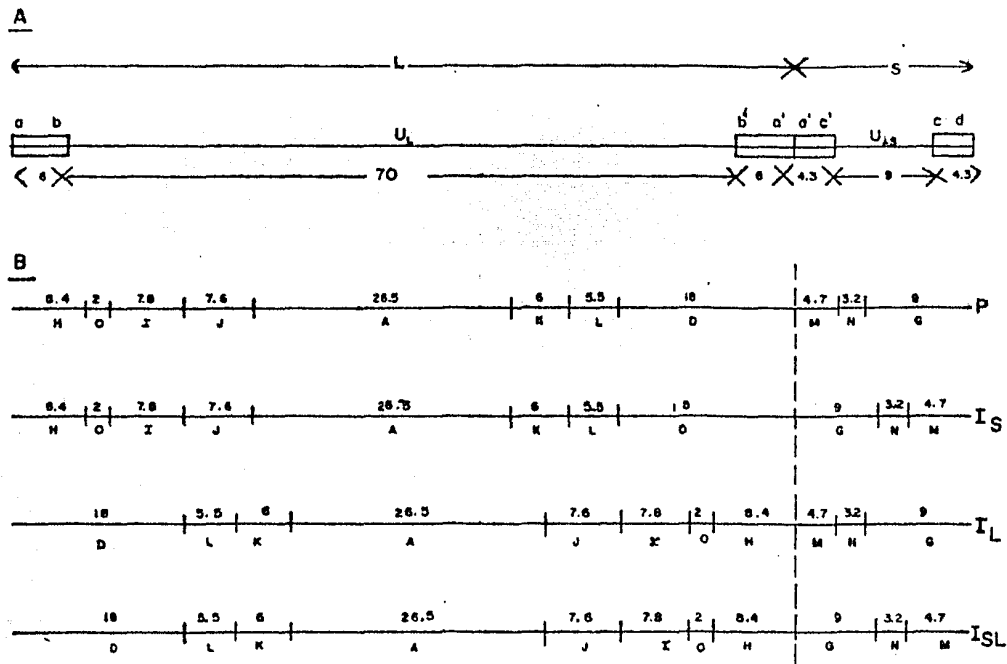


Figura 2. ESTRUCTURA DEL DNA DE HSV. (A) ARREGLO DE LA SECUENCIA DE DNA DE HSV-1. EL TAMAÑO DE LAS SECUENCIAS UNICAS (U_L Y U_S) AL IGUAL QUE LAS SECUENCIAS OD Y CO Y $b' a' o' c'$, ESTAN DADAS COMO PESOS MOLECULARES $\times 10^6$. EL ARREGLO Y EL TAMAÑO DE LAS SECUENCIAS SON SIMILARES PARA EL DNA DE HSV-2. (B) MAPAS DE RESTRICIÓN EN LOS CUATRO POSIBLES ARREGLOS DEL DNA DE HSV-1. P=ARREGLO PROTOTIPO, I_S , I_L E I_{SL} CORRESPONDEN A LOS ARREGLOS "S" INVERTIDO, "L" INVERTIDO Y "SL" INVERTIDOS. (BUCHMAN, TG; ET AL. 1980)

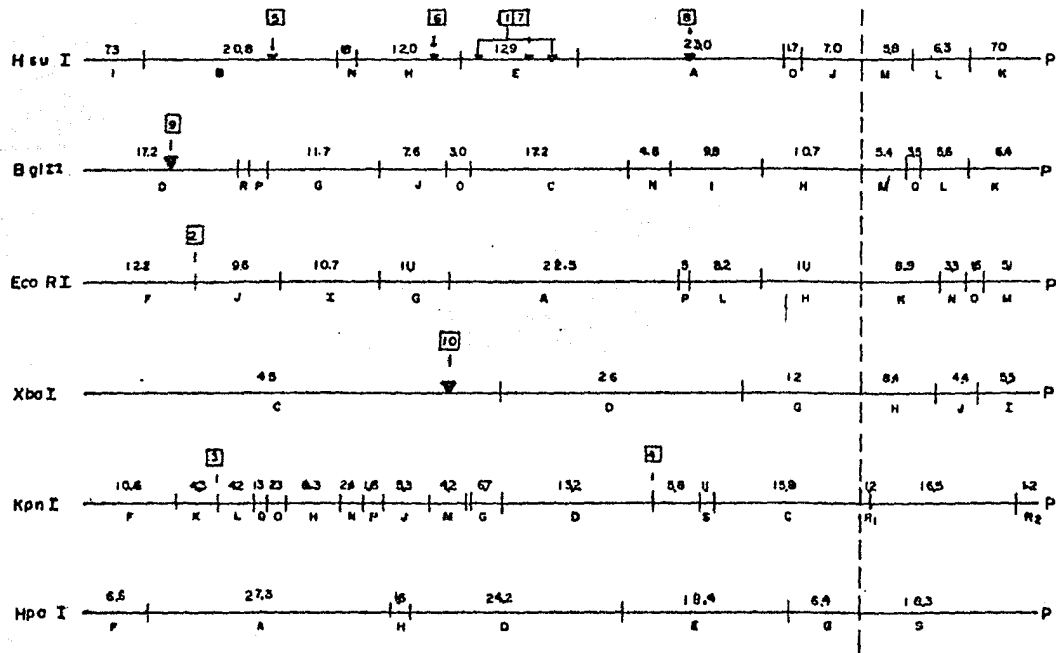


Figura 4. VARIABILIDAD EN LAS SECUENCIAS DEL DNA DE HSV-2 MAPAS DE RESTRICCIÓN DE Hsu I, Bgl II, Eco RI, Hpa I, Xba I y Kpn I. NOTESE LA DIFERENCIA EN LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN CON RESPECTO A LA FIGURA ANTERIOR. (BUCHMAN, Y & ET AL. 1980)

- Las diferencias entre los patrones de restricción de los virus aislados parecen ser estables tanto in vivo como in vitro (8).

En el presente trabajo, se pretende desarrollar un método de diagnóstico y tipificación del virus Herpes Simple en infecciones causadas por él, basado en el análisis de los fragmentos resultantes de la digestión del DNA viral con enzimas de restricción. La observación de los fragmentos separados por electroforesis en base a su tamaño, puede realizarse por tinción con bromuro de etidio ó nitrato de plata.

III. OBJETIVOS.

1. Establecer las condiciones de trabajo que habrán de ser útiles en la implantación del método en el laboratorio.
2. Establecer y modificar el método a un estado óptimo con el uso de cepas prototipo de HSV adaptadas al cultivo en laboratorio, tanto tipo 1 como tipo 2, de manera que pueda ser utilizable en un laboratorio de diagnóstico.
3. Probar la metodología con muestras clínicas de infecciones herpéticas y verificar si se lleva a cabo de manera satisfactoria.
4. Tratar de eliminar la necesidad de multiplicar al virus en cultivos celulares, detectándolo directamente de las muestras en base al mismo principio.

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.

El DNA de HSV-1 y el de HSV-2 difieren en la posición de muchos sitios de corte con algunas enzimas de restricción. Así, cuando el DNA de HSV se digiere con alguna de estas enzimas, los fragmentos obtenidos producen un patrón de restricción que puede discriminar los dos tipos de HSV.

V. MATERIALES Y METODOS.

A. CELULAS Y VIRUS.

Se utilizaron células Vero para propagar el HSV y para infectar con el virus proveniente de muestras clínicas: fueron establecidas en 1962 a partir de un riñón de mono verde africano adulto; presentan una morfología similar a fibroblastos.

Las cepas de HSV utilizadas como referencia son: la cepa MP que es una mutante de HSV-1 capaz de producir fusión celular y macroplacas (22); la cepa VR-3 (McIntyre), utilizada como prototipo de HSV-1 y aislada de un paciente con encefalitis; las cepas KOS y FU-2, utilizadas como prototipo de HSV-1; y, la cepa MS, como prototipo de HSV-2, aislada del cerebro de una persona adulta con esclerosis.

B. REACTIVOS.

1. Medio de Cultivo. Se utiliza Medio Mínimo Escencial Eagle modificado de Flow Laboratories con 100000 U de Penicilina, 100 mg de Estreptomina, 8 mg de Garamicina y Fungizona. Además, contiene bicarbonato de sodio al 0.88% y rojo de fenol como indicador de pH.

Cuando se utiliza en la propagación de células se agrega además, suero fetal de bovino inactivado a 56°C por 30 minutos a una concentración del 8%. El medio que se utiliza en la recolección de las muestras contiene 4% de suero fetal de bovino (SFB) y el doble de antibióticos. El medio se almacena a 4°C.

2. Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). Contiene 8 g de cloruro de sodio, 0.2 g de cloruro de potasio, 0.2 g de fosfato monobásico de

potasio, 1.15 de fosfato dibásico de sodio, 0.1 g de cloruro de calcio, 1.88 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 1 litro. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

El PBS utilizado en el ensayo de infectividad del DNA viral carece de cloruro de calcio y de cloruro de magnesio; los demás reactivos se encuentran a la misma concentración.

3. MEM-Tris. Se prepara mezclando tres volúmenes de MEM sin bicarbonato de sodio y un volumen de Tris 0.2 M pH 7.4. Se almacena a 4°C.

4. Proteinasa K. 50 mg de Proteinasa K "Sigma" se disuelven en 5 ml de agua desionizada y se almacena a -20°C.

5. Bromuro de etidio. Se hace una solución concentrada con 10 mg/ml y se guarda a 4°C. Es extremadamente cancerígeno; NO debe tenerse contacto directo con él.

6. Solución amortiguadora "alta sal". Contiene cloruro de sodio 100 mM, Tris.HCl 50 mM pH 7.5, cloruro de magnesio 10 mM y 1 mM de ditiotreitól. Se hace una solución concentrada 10 veces (10X) y se guarda a 4°C.

7. Solución amortiguadora "media sal". Contiene cloruro de sodio 50 mM, Tris.HCl 10 mM pH 7.5, cloruro de magnesio 10 mM y ditiotreitól 1 mM. Se prepara una solución 10X y se almacena a 4°C.

8. Solución amortiguadora de lisis. Contiene Tris.HCl 10 mM pH 7.9, EDTA 10 mM y Tritón X-100 al 0.25%.

9. Fenol saturado. Se preparan 250 ml de una solución Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.1 y se va agregando poco a poco en 150 ml de fenol destilado con agitación constante hasta llegar a la saturación. Si se forma una emulsión, se

pueden agregar unos cristales de cloruro de sodio hasta que se separen bien las dos fases. Se almacena a 4°C, protegiéndolo de la luz.

10. Solución amortiguadora estandar de reticulocitos. Contiene Tris 10 mM pH 7.5, cloruro de magnesio 1 mM y cloruro de sodio 10 mM. Se prepara una solución 5X.

11. Amortiguador Tris-Acetato. Se prepara una solución 10X, disolviendo 4.58 ml de ácido acético glacial, 1.025 g de acetato de sodio anhidro, 0.93 g de EDTA disódico dihidratado y 12.22 g de Tris base en 250 ml.

12. Amortiguador Tris-Borato (TBE). Contiene 89 mM de Tris base, 89 mM de ácido bórico y 2.5 mM de EDTA con un pH de 8.2. Se prepara una solución 10X.

13. Solución de plata amoniacal. Se prepara mezclando 21 ml de Hidróxido de sodio al 0.36%, 1.4 ml de Hidróxido de amonio al 28% y 1 ml de nitrato de plata al 20%; se completa a 100 ml con agua desionizada.

14. Las enzimas de restricción utilizadas son de la marca Bio-Labs y tienen una concentración de 16000 U/ml EcoRI, 24000 U/ml HindIII y 20000 U/ml BamHI. Todas deben almacenarse a -20°C.

15. Mezcla de colorantes. A la solución amortiguadora utilizada en la electroforesis (Tris-Acetato o TBE) se adiciona glicerol al 15%, azul de bromofenol al 0.005% y xilencianol al 0.005%. Los colorantes sirven como marcadores durante la electroforesis.

C. METODOLOGIA.

1. INFECCION DE CELULAS CON HSU.

a) A una monocapa confluyente de células Vero contenidas en un frasco

de 75 cm² de superficie (crecidas con 14 ml de medio), se les retira el medio de cultivo por aspiración con vacío.

b) Las células se lavan con 10 ml de PBS, y éste se desecha.

c) Se agrega el lisado en cantidad deseada, de acuerdo a la MOI requerida y se completa con Medio de cultivo sin suero (MEM s/s), en caso de que se requiera, hasta 1.5 ml.

d) Se deja absorber el virus durante 60 min a 37°C, tiempo durante el cual el recipiente se agita suavemente cada 15 min para mantener a las células en contacto con el virus.

e) Se retira el inóculo por aspiración con vacío.

f) Las células se lavan nuevamente con PBS y éste se retira.

g) Se agregan 14 ml de medio de cultivo sin suero (MEM s/s)

h) Se deja incubar a 37°C en una estufa con atmósfera de CO₂ al 5% hasta la aparición de ecp.

i) Cuando el virus se requiere para la propagación, la MOI debe ser menor de 0.01 y el lisado utilizado para infectar se obtiene como sigue: las células infectadas se desprenden del recipiente, se sonicán 2 veces durante 20 seg. en un sonicador Branson 185 y los restos celulares se separan por centrifugación a 1500 xg/10 min/ 4°C. El sobrenadante se utiliza para infecciones posteriores.

2. RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CLINICAS.

a) La lesión se raspa con un hisopo humedecido en MEM con suero fetal

de bovino al 4%. Se realiza por duplicado.

b) El hisopo se introduce en 2 ml del mismo medio y se agita violentamente.

c) El tubo de ensayo con la muestra debe almacenarse inmediatamente en hielo para su transporte ó guardarse a 4°C para evitar la inactivación del virus.

d) Se utiliza 1 ml de esta muestra como inóculo en la infección de células Vero, como se describió anteriormente.

3. CUANTIFICACION DE PARTICULAS VIRALES. ENSAYO EN PLACA.

a) Las células se cultivan en una caja de 24 pozos con una area total disponible de 48 cm².

b) Se hacen diluciones decimales del lisado que se quiere titular desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ con MEM s/s.

c) Cuando la monocapa celular está totalmente confluyente, se retira el medio de cultivo de cada pozo por aspiración con vacio.

d) A cada pozo se agrega 1 ml de PBS para lavar las células y nuevamente se retira por aspiración con vacio.

e) Se inocula con 0,2 ml de cada dilución de lisado por pozo, por triplicado. Se utilizan tres pozos como control negativo con MEM s/s.

f) El virus se deja absorbiendo 60 min a 37°C, agitando suavemente.

g) Se retira el inóculo por aspiración con vacio.

h) Las células se lavan agregando PBS y retirándolo con vacio.

i) A cada pozo se agrega 1 ml de MEM con 2% de suero humano (inactivado 30 min a 56°C) que tenga anticuerpos neutralizantes contra HSV con un título mayor o igual de 512 por reducción del 50% en el número de placas, descrito posteriormente.

j) Se incuba a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5% hasta la formación de placas (aproximadamente 48 hrs).

k) Se cuentan las placas formadas y, en base a la dilución y al volumen del inóculo, se determina el título en ufp/ml (unidades formadoras de placa por mililitro).

Las placas pueden contarse directamente al microscopio ó tñiéndolo con Cristal violeta, de la siguiente forma:

-) Se retira el medio de cultivo
 -) Se añade 1 ml de formol al 4% durante 5 min y se retira
 -) Se lava con agua corriente
 -) Se agregan 0.2 ml de Cristal violeta al 1% en etanol al 50% en cada pozo.
- Después de 2-3 min, se retira y se lava con agua corriente.

4. TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-HSV EN SUERO HUMANO POR NEUTRALIZACION

a) El suero se inactiva calentándolo a 56°C durante 30 min. Se hacen diluciones 2X de éste (1:16, 1:32, 1:64 ...) con MEM s/s.

b) Se hacen las diluciones necesarias del lisado de HSV, previamente titulado, de manera que se obtengan 500 y 5000 ufp/ml.

c) Se mezcla 0.5 ml de cada dilución de suero con 0.5 ml de cada dilución de lisado. Como controles positivos se utilizan 0.5 ml de MEM s/s con 0.5

ml de cada dilución de lisado y, como control negativo, 0.5 ml de la dilución más pequeña de suero con 0.5 ml de MEM s/s.

d) Estas mezclas se incuban a 25°C durante 30 min.

e) Por otro lado, se retira el medio de cultivo a cada uno de los pozos de una caja de 24, por aspiración con vacío.

f) Las células se lavan con 1 ml de PBS por pozo y se retira éste por aspiración con vacío.

g) Se inoculan 0.2 ml de cada una de las mezclas hechas con anterioridad, por duplicado, al igual que los controles positivos y negativos.

h) El virus se deja absorber 60 min a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, agitando constantemente.

i) Se retira el inóculo y se agrega PBS para lavar las células, ambos, por aspiración con vacío.

j) En cada pozo se agrega 1 ml de MEM con 2% de suero humano que contenga anticuerpos neutralizantes contra HSV (con un título mayor de 1:128).

k) Se incuba a 37°C con atmósfera de CO₂ 5% hasta la formación de placas.

l) Se cuentan las placas en los pozos correspondientes a las distintas diluciones de suero y en los controles positivos y se promedian (para una misma dilución).

m) El título se reporta como aquella dilución en que se reduce en 50% el número de placas, de acuerdo a:

$$\log_2 X = \log_2 n - \frac{PR > 50 - 50}{PR > 50}$$

en donde:

X- dilución buscada
n- dilución inmediata que redujo más del 50% de placas
PR- % de placas reducidas en "n"

5. PURIFICACION DEL DNA DE HSV POR GRADIENTES DE CsCl (52).

a) Las células infectadas con un ecp > 80% correspondientes a 150 cm² de superficie se desprenden del frasco completamente y se centrifugan a 800 xg durante 15 min a 4°C.

b) El botón celular se lava con PBS frío y nuevamente se centrifuga en las mismas condiciones.

c) El botón se resuspende en 0.9 ml de EDTA 10 mM pH 8.0 y se agrega Dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración final de 0.6%.

d) Cuando desaparece la turbidez, se agrega 0.3 ml de Proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml para dar una concentración final de 2 mg/ml. Se incuba a 37°C durante 3 hr.

e) Se agrega la misma cantidad de proteasa y se incuba nuevamente a la misma temperatura por 16 hr más.

f) Con el material resultante de la digestión se hace un gradiente de la siguiente forma: Se diluye el material digerido con Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5 y se agrega CsCl y bromuro de etidio hasta dar una densidad de 1.566 y una concentración de 100 µg/ml respectivamente. La densidad se ajusta por el índice de refracción.

g) Esta mezcla se centrifuga a 42000 rpm/ 70 hr/ 10°C en un rotor Beckman Ti50.

h) Se obtienen dos bandas visibles con luz UV onda corta. La banda inferior corresponde al DNA de HSV y se puede recolectar por goteo del gradiente, o de manera menos efectiva, por aspiración con una jeringa.

i) El material recolectado del gradiente se extrae con n-Butanol saturado con NaCl 3 veces y el DNA que se encuentra en la fase acuosa se precipita con dos volúmenes de Etanol y un volumen de Acetato de sodio 2. M; finalmente, se resuspende en Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5.

6. ENSAYO DE INFECTIVIDAD DEL DNA DE HSV (19).

a) El ensayo se realiza en una caja de 24 pozos con una superficie disponible de 2 cm² por pozo. Una vez que las células están confluentes, se les retira el Medio de cultivo por aspiración con vacío.

b) Se lavan con 1 ml de PBS libre de Calcio y Magnesio, se retira el sobrenadante con vacío.

c) Las células se lavan con MEM-Tris y nuevamente se retira el sobrenadante.

d) Las células se tratan con una solución de DEAE-Dextrán 500 ug/ml en MEM-Tris durante 30 min a 25°C.

e) Las células se inoculan con DNA viral disuelto en MEM-Tris y con Cloruro de Calcio a una concentración final de 0.125 M. Esto se realiza por triplicado.

f) Como control positivo se inoculan las células con el virus y como

control negativo se utiliza MEM s/s.

g) El DNA ó, en su caso, el virus se deja absorber durante 1 hr a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%.

h) Se retira el inóculo y se añade 1 ml de MEM con 2% de suero humano que contenga anticuerpos contra HSV.

i) Se incuba a 37°C en la mismas condiciones, hasta que se observa ecp o placas líticas.

7. OBTENCION DE DNA DE HSV POR PRECIPITACION CON NaCl (PIGNATTI, 38).

a) Las células infectadas con ecp > 80% correspondientes a 150 cm² de superficie se desprenden del recipiente en que se encuentran y se centrifugan a 800 xg durante 15 min a 4°C. Se desecha el medio de cultivo.

b) El botón se resuspende en 10 ml de PBS, se agita suavemente y nuevamente se centrifugan. El sobrenadante se desecha.

c) El botón se resuspende en 1.5 ml de solución amortiguadora de lisis y se agita suavemente durante 10 min a 25°C.

d) Se agrega NaCl 5 M para dar una concentración final de 0.2 M; inmediatamente se agita por inversión y se centrifuga a 1500 xg durante 10 min a 4°C. El botón se desecha.

e) Al sobrenadante se agrega Proteinasa K 20mg/ml, SDS 10% y Tris-EDTA 50-50 mM pH 7.5 para dar concentraciones finales de 100 µg/ml, 0.2% y 10-10 mM, respectivamente. Se incuba a 37°C durante 2 hr aproximadamente.

f) Se extrae con un volumen igual de Fenol saturado con Tris-EDTA 10-1

mM pH 8.1 2 veces y con un volumen de Cloroformo 2 veces.

g) Se agrega 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de Acetato de sodio 2 M y, se agita. Se deja toda la noche a -20°C para precipitar el DNA (ó en hielo seco durante 30 min).

h) Se centrifuga a 21000 xg durante 30 min a 4°C y se decanta.

i) Se evapora todo el etanol y el botón se resuspende en 30 µl de Tris EDTA 10-1 mM pH 7.5.

8. OBTENCION DEL DNA DE HSV POR SEPARACION DE NUCLEOS (ARENS, 1).

a) Las células infectadas con un ecp > 80% correspondientes a una area de 150 cm² se desprenden del recipiente en el que se encuentran y se centrifugan a 800 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se desecha.

b) El botón se resuspende en 10 ml de PBS, se agita suave y nuevamente se centrifugan. El sobrenadante se desecha.

c) El botón se resuspende en 4.5 ml de amortiguador estandar de reticulocitos y se incuba 1 hr a 0°C con agitación suave.

d) Se homogeniza en un Homogenizador Eberbach con 20 golpes sobre un baño de hielo.

e) La suspensión se centrifuga a 2000 xg durante 5 min a 4°C. El botón se desecha.

f) El sobrenadante se ajusta con EDTA 50 mM, Proteinasa K 10 mg/ml y SDS 10% a concentraciones finales de 5 mM, 200 µg/ml y 0.05% respectivamente. Se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.

g) Finalmente, se extrae y se precipita de la misma manera que en el método anterior.

9. OBTENCION DE DNA DE HSV POR PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL (7).

a) Las células infectadas con ecp del 100% se desprenden totalmente del recipiente en que están contenidas. El lisado se congela-descongela tres veces.

b) El lisado se centrifuga a 800 xg durante 15 min a 4°C. Se decanta y el botón se desecha.

c) Al sobrenadante se le agrega Polietilenglicol (PEG) al 50% con peso molecular promedio de 6000 para dar una concentración final de 10% y NaCl para dar una concentración final de 0.5 M. Se agita y se deja reposar 2 hr a 4°C.

d) Se centrifuga a 20000 xg durante 30 min a 4°C; se decanta y el sobrenadante se desecha.

e) El botón se resuspende en Tris-EDTA 10-1 mM pH 7.5 de manera que el material precipitado esté diez veces concentrado.

f) Se agrega SDS al 10% para dar una concentración final de 1.5%.

g) El DNA viral se extrae y se precipita de la misma forma como se describió anteriormente.

10. DIGESTION DEL DNA DE HSV CON ENZIMAS DE RESTRICCION.

El DNA obtenido por los distintos métodos de extracción se trata de la siguiente forma: Se mezclan 1/3 del material extraído con 5 Unidades de Enzima. Amortiguador "alta sal" ó "media sal" 10X, según la enzima utilizada, espermi-

dina 100 mM (0.4 ul por cada 10 µl de volumen de reacción) y agua desionizada si se requiere. El amortiguador "alta sal" se utiliza en las digestiones con EcoRI, mientras que el amortiguador "media sal" se utiliza en las digestiones con HindIII y BamHI. En todos los casos se incuba a 37°C durante la reacción.

En algunas ocasiones se utilizó DNA del fago lambda como control de que la digestión con las enzimas de restricción se estaba llevando a cabo de manera correcta.

11. ELECTROFORESIS.

Antes de realizar la electroforesis, la muestra se trata de la siguiente manera: se agregan 5 µl de la mezcla de colorantes y se calienta a 65°C durante 5 min para deshacer agregados.

a) Geles de Agarosa. Se hace un gel horizontal de agarosa al 0.7-0.8% de 11 X 5 X 0.3 cm, se carga la muestra y se corre a 100 volts durante 1 hr, ó hasta que el azul de bromofenol llegue al borde del gel, en solución amortiguadora Tris-Acetato.

El gel de agarosa puede teñirse con Bromuro de etidio, adicionándolo a una concentración de 100 ng/ml en la solución de Tris-Acetato y observando bajo luz UV. Los fragmentos producidos en la digestión pueden tambien visualizarse por tinción con nitrato de plata (descrita posteriormente).

b) Los Geles de Poliacrilamida se hacen al 5% en base a la siguiente fórmula:

- 4.12 ml de Acrilamida-Bis acrilamida 30%-0.8%
- 2.5 ml de Amortiguador TBE 10X
- 18.1 ml de Agua desionizada
- 9.5 ml de TEMED
- 225 ul de Persulfato de amonio 10%

las dimensiones del gel son 14 X 20 X 0.2 cm. Se colocan las muestras y se corre a 200 volts durante 4 hr (ó a 50 volts durante 16 hr) en amortiguador TBE 1X. El gel se tiñe con Nitrato de plata.

12. TINCION CON NITRATO DE PLATA.

a) En geles de Agarosa (42):

-) El gel se enjuaga con agua desionizada
-) Se seca a 37°C, con un papel filtro encima
-) El gel se coloca en glutaraldehido al 3%, 15 min con agitación
-) Se enjuaga con agua desionizada tres veces
-) Se agrega la solución de plata amoniacal y se retira hasta que aparecen las bandas.
-) Se puede utilizar Acido acético al 10% para fijar la tinción.

b) En geles de Poliacrilamida:

-) El gel se coloca en una solución de etanol-ac. acético 10%-0.5% por 30 min
-) Se coloca en una solución de nitrato de plata al 0.18% durante 30 min
-) El gel se enjuaga dos veces con agua desionizada, desechando cada lavado
-) Se coloca en una mezcla de Formol y NaOH (0.4 ml de formaldehido al 38% y 50 ml de NaOH al 3%) hasta que aparecen las bandas
-) La tinción puede fijarse con Acido acético al 1%. Lavar con agua desionizada.

VI. RESULTADOS.

1. Condiciones de propagación del virus Herpes Simple.

Se establecieron las condiciones óptimas de propagación del virus Herpes Simple cepa MP en el laboratorio; considerando principalmente, el efecto producido por la multiplicidad de infección (MOI) y por la temperatura en la producción de partículas infecciosas. Como se muestra en la tabla RI, la cantidad de partículas infecciosas fué muy variable (desde 10^4 hasta 10^8 ufp/ml), sin embargo el título promedio obtenido estuvo alrededor de 6 log₁₀ ufp/ml. Asimismo se observa que una MOI alta (mayor de 1) mantenida por varios pases consecutivos produce una disminución considerable en el rendimiento de partículas infecciosas, por lo tanto se consideró conveniente utilizar MOI menores de 0.1 ufp por célula en pases subsecuentes.

TABLA 5. CONDICIONES DE PROPAGACION DEL VIRUS %.

EXPTO	MOI (ufp/cel)	TEMP. INCUB (°C)	TIEMPO DE COSECHA (hr) Y ECP (%) [⊗]	TITULO (log ₁₀ ufp/ml)
0				5.44
1	0.002	37	96	5.55
2	0.0072	37	96	6.11
3	0.0002	37	72	3.17
4	0.08	34	48	5.9
5	0.4	34	----	6.11
6	1.73	37	18 (100)	8.17
7	18	37	20 (100)	9.7
8	2	34	24 (80)	5.8
	2	37	24 (100)	7.17
9	0.034	37	----	4.7
10	0.0005	37	48 (70)	4.06
11	0.0005	37	96	7.17

* La absorción del virus a la célula se realizó a 37°C durante 1 hr.

⊗ La cosecha del virus se realizó sonicando el lisado y separando restos celulares.

Con respecto a la temperatura de incubación, no existió diferencia significativa en el rendimiento de partículas infecciosas, como se ve en el experimento 9 de la tabla 5. Por otro lado, se cuantificó el virus liberado al medio de cultivo y el virus intracelular, después de incubar a 34 y a 37°C respectivamente y se observó que la temperatura no influyó en la liberación de partículas infecciosas al medio extracelular.

Un dato que es importante considerar es el efecto que tiene el almacenaje de un lisado en la inactivación del virus, como se muestra en seguida: el pase 3 de la cepa VR-3 de HSV-1 tenía un título de 5×10^6 ufp/ml, después de 9 meses almacenado a 4°C el título disminuyó a 5×10^3 ufp/ml.

Se multiplicaron otras cepas de HSV (KOS, FU-2, y MS), en células Vero utilizando condiciones semejantes a las de la cepa MP pero el rendimiento de partículas virales no fue tan bueno; los títulos no fueron mayores de 10^6 ni menores de 10^4 ufp/ml.

Después de establecer las condiciones de propagación del virus HSV-1 cepa MP, se procedió a buscar las condiciones óptimas en la extracción del DNA viral a partir de células infectadas, en base a los métodos descritos por Arans et al (1) y Pignatti (38), principalmente. Los métodos se describieron en la sección anterior.

2. Condiciones de extracción del DNA viral.

En la Tabla 6 se detallan las condiciones que fueron modificadas en cada uno de los métodos, así como los resultados en cada experimento. Es necesario mencionar que en algunos experimentos no se cuantificó el número de partículas virales, pero en esos casos se cuantificó el material extraído por Densidad óptica a 260 mμ.

Tabla. 6. A. CONDICIONES DE EXTRACCION DE DNA VIRAL. METODO ARENS.

EXP.	CEPA	CANTIDAD DE CELULAS	RECOLECCION hrs. (% ecp)	TITULO (UFY/ml)	VARIACIONES					RESULTADOS	
					CONCENTRACION DE CELULAS	No. GOLPES	RNAse	ENZ/ GEL	OTROS	DNA EXTRAIDO	OBSERVACIONES
1.	MP	7.3×10^8	48(100%)	—	4.1×10^5	25	NO	HIND III/AGAROSA	DNA λ CONTROL	0	
2.	MP	2.5×10^8	96 (50%)	—	3.1×10^6	25	NO	HIND III/AGAROSA	DNA λ CONTROL	13.2 UG	SE OBSERVAN 3 FRAGMENTOS DEBILMENTE CON PM λ DIGESTION DNA
3.	MP	2.5×10^8	96 (90%)	—	3.1×10^6	25	NO	Eco RI/AGAROSA	—	10.8 UG	NO SE VE DIGESTION, SOLO UNA BANDA QUE NO PENETRA AL GEL.
4.	MP	7.5×10^6	48 (100%)	—	3×10^6	25	NO	Eco RI/AGAROSA	DNA λ CONTROL	7.2 UG	NO DIGESTION DE DNA λ INTERNO.
5.	MP	1.5×10^7	24 (100%)	—	3×10^8	35	NO	Eco RI/AGAROSA	DNA λ CONTROL	—	DIGESTION POSITIVA DE CONTROLES DE DNA λ . CON RNAse SE ELIMINA ALGO DE BASURA, PERO EXISTE UNA BANDA INTENSA QUE NO PENETRA AL GEL.
							SI	Eco RI/AGAROSA	DNA λ CONTROL	—	
6.	MP	1.5×10^7	48 (80%)	—	3×10^6	30	NO	Eco RI/AGAROSA	DNA λ CONTROL	7.2 UG	NO HAY DIGESTION DEL DNA λ QUE SE USA COMO CONTROL INTERNO.
15.	MP	1.25×10^7	48 (100%)	—	2.7×10^6	20	NO	Eco RI/AGAROSA (PLATA)			DIGESTION POSITIVA, SE OBSERVAN 4-5 BANDAS RECONOCIBLES. LA MAYORIA DE LOS FRAGMENTOS NO SE SEPARAN POR SU ALTO PM. ESTOS FRAGMENTOS CORRESPONDEN CON ALGUNOS DEL EXTRACTO PIGNATTI DEL MISMO EXPTO
16.	MP	1.5×10^7	48 (100%)	5×10^7	3.3×10^6	20	NO	Eco RI/AGAROSA (PLATA)	ADICION DE RNA		SE OBSERVAN LAS MISMAS BANDAS QUE EN EL EXTRACTO PIGNATTI SOLAMENTE QUE EN MENOR CANTIDAD. DIGESTION POSITIVA.
								BAN HI (PLATA) POLIACRILAMIDA			

CONTINUACION Tabla 6-A.

17.	VR3	1.5×10^7	72(100%)	10^8	3.3×10^6	20	NO	BAM HI(PLATA) POLIACRILAMIDA	ADICION DE RNA	DIGESTION POSITIVA. PATRON ELECTROFORETICO CARACTERISTICO DE HSV-1 (SEMEJANTE A LA CEPA MP SALVO ALGUNOS FRAGMENTOS). MUY poca CANTIDAD DE MATERIAL QUE CON EL EXTRACTO PIGNATTI.
-----	-----	-------------------	----------	--------	-------------------	----	----	---------------------------------	----------------	---

Tabla 6-B. CONDICIONES DE EXTRACCION DE DNA VIRAL. METODO PIGNATTI.

EXP	CEPA	CANTIDAD DE CELULAS	RECOLECCION hrs. (% ecp)	TITULO (UFP/ml)	CONCENTRACION DE CELULAS	VARIACIONES				RESULTADOS	
						No. GOLPES	RNAse	ENZ/GEL.	OTROS	DNA EXTRAIDO	OBSERVACIONES.
7.	MP	1.5×10^7	48(100%)		1.5×10^7		SI	Eco RI/AGAROSA	DNA x CONTROL	180 UQ	DIGESTION DNA-A INTERNO /M. PERO SE OBSERVA UNA BANDA INTENSA QUE NO ENTRA AL GEL.
8.	VR3	1.5×10^7	48(100%)	LISADO 4×10^6 MEDIO 4×10^6	1.5×10^7		SI	Eco RI/AGAROSA	DNA x CONTROL	49.8 UQ	DIGESTION DNA-A INTERNO. SE OBSERVA GRAN CANTIDAD DE MATERIAL, PERO NINGUN FRAGMENTO RECONOCIBLE.
15.	MP	1.25×10^7	48(100%)		8.3×10^6		NO	Eco RI/AGAROSA (PLATA)			DIGESTION POSITIVA. SE OBSERVAN 10 BANDAS MUCHAS CORRESPONDEN A FRAGMENTOS DE DNA DE HSV-1 PROTOTIPO
16.	MP	1.5×10^7	48(100%)		10^7		NO	Eco RI/AGAROSA (PLATA) BAM HI POLIACRILAMIDA	ADICION DE RNA		DIGESTION POSITIVA. SE OBSERVA UN PATRON ELECTROFORETICO RECONOCIBLE COMO HSV-1 PROTOTIPO.
17.	VR3	1.5×10^7	72(100%)	$>10^8$	10^7		NO	BAM HI	ADICION DE RNA		DIGESTION POSITIVA. PATRON ELECTROFORETICO SIMILAR AL DNA DE HSV-1 PROTOTIPO (VER FIGURA 6).

La multiplicidad de infección nunca fué mayor de 0.27 excepto en el experimento B en que fué de 3

La concentración de células está referida al número de células por volumen de solución, según el método, solución de lisis o solución estandar de reticulocitos.

El número de golpes en el método ARENS se refiere a los golpes en un Homogenizador de tejidos tipo Dauncer.

Se utilizaron gradientes de CsCl para determinar si se obtenía DNA viral en los extractos y para observar el rendimiento del mismo con cada uno de los métodos practicados, comparando con el material obtenido con una extracción directa. El primer objetivo se logró de la siguiente forma: se observaron dos bandas de DNA teñidas con bromuro de etidio en el gradiente; con cada una de ellas se realizó una digestión con EcoRI y Hind III, resultando un patrón electroforético reconocible como HSU-1 y, un ensayo de infectividad que resultó positivo para la banda más densa, con lo cual se determinó que ésta correspondía al DNA viral. El resultado positivo del ensayo de infectividad se observa por un efecto citopático ó producción de placas líticas semejantes a las producidas por el virus completo.

Cuando se realizaron gradientes con los extractos de los distintos métodos, utilizando el mismo lisado, se determinó que:

- a). Existe una pérdida considerable de DNA, tanto celular como viral, cuando se utilizan los métodos basados en la separación de núcleos y en la precipitación de DNA con NaCl.
- b). El método basado en la precipitación de DNA con NaCl es más eficaz para la obtención de DNA viral con respecto al que se basa en la separación de núcleos, como se verificó posteriormente al realizar electroforesis (Figura 5); sin embargo, ninguno de los dos es selectivo ya que también se obtiene DNA celular.
- c). La cantidad de DNA viral obtenido estuvo en función directa con la cantidad de partículas infecciosas presentes en el lisado, la cual varió de 10^3 ufp/ml a 7×10^8 ufp/ml.

La cantidad de DNA viral extraída, después de separar por gradientes de CsCl, se estimó comparando las intensidades de las bandas en dichos gradientes,

teñidos con bromuro de etidio, con diferentes cantidades de DNA del fago lambda y varió desde un mínimo de 0.5 microgramos (que puede ser menos pero que por la sensibilidad de la tinción no se sabe con certeza), hasta 2.5 microgramos, en aquel caso en que las células fueron tratadas con SDS/proteasa exclusivamente (descrito en métodos).

En el experimento 16 de la Tabla 6 están descritas las condiciones por las que se logró obtener suficiente DNA viral para observar patrones de restricción despues de la extracción con los métodos Arens y Pignatti. Tomando en cuenta que se parte de un lisado con un título de 5×10^7 ufp/ml, se deter-

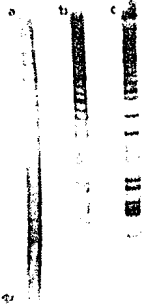


Figura 5. PATRONES DE RESTRICCIÓN DE HSV-1 CON LA ENZIMA Bam HI. a).- DNA DE LA CEPA VR-3, EXTRAIDO CON EL METODO ARENS; b).- DNA DE LA CEPA VR-3, EXTRAIDO CON EL METODO PIGNATTI; c).- DNA DE LA CEPA MP, EXTRAIDO CON EL METODO PIGNATTI. EN TODOS LOS CASOS SE UTILIZARON CANTIDADES EQUIVALENTES DE EXTRACTO.

minó que se requiere una cantidad mínima de partículas infecciosas (en la fracción celular del lisado) igual a 4.3×10^8 para que los patrones de restricción/BamHI sean observables en geles de poliacrilamida teñidos con Nitrato de plata.

Los patrones electroforéticos obtenidos en geles de poliacrilamida después de la digestión con BamHI se observan en la Figura 5. El primero y segundo carril corresponden al DNA de la cepa VR-3 (HSV-1) obtenido por los métodos Arens y Pignatti, respectivamente; el tercer carril corresponde al DNA de la cepa MP (HSV-1) obtenido con el método Pignatti. Las condiciones de electroforesis se mencionan en Métodos.

También se extrajo DNA viral a partir del material precipitado con polietilenglicol (PEG), para tratar de obtener patrones de restricción visibles. Para ello, se infectaron 9.7×10^7 células a una multiplicidad de infección igual a 10, resultando un título de 1.25×10^5 ufp/ml (140 ml en total); después de precipitar con PEG, el título bajó a 4.3×10^3 ufp/ml, es decir, la cantidad total de partículas infecciosas disminuyó aproximadamente 100 veces. El DNA viral obtenido se digirió con la enzima EcoRI pero no se observó fragmento alguno en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, solamente un barrido intenso.

Se hizo otro experimento precipitando con PEG un lisado con título de 5×10^6 ufp/ml; el material precipitado se trató con proteasa/SDS y se separó en gradientes de CsCl. Se obtuvo una sola banda que por absorbancia a 260 nm, se supo eran 2 microgramos; pero no se observa un patrón electroforético reconocible después de digerir con EcoRI, solamente un barrido intenso, lo que sugirió que se trataba de DNA celular.

3. Recolección y tratamiento de muestras clínicas.

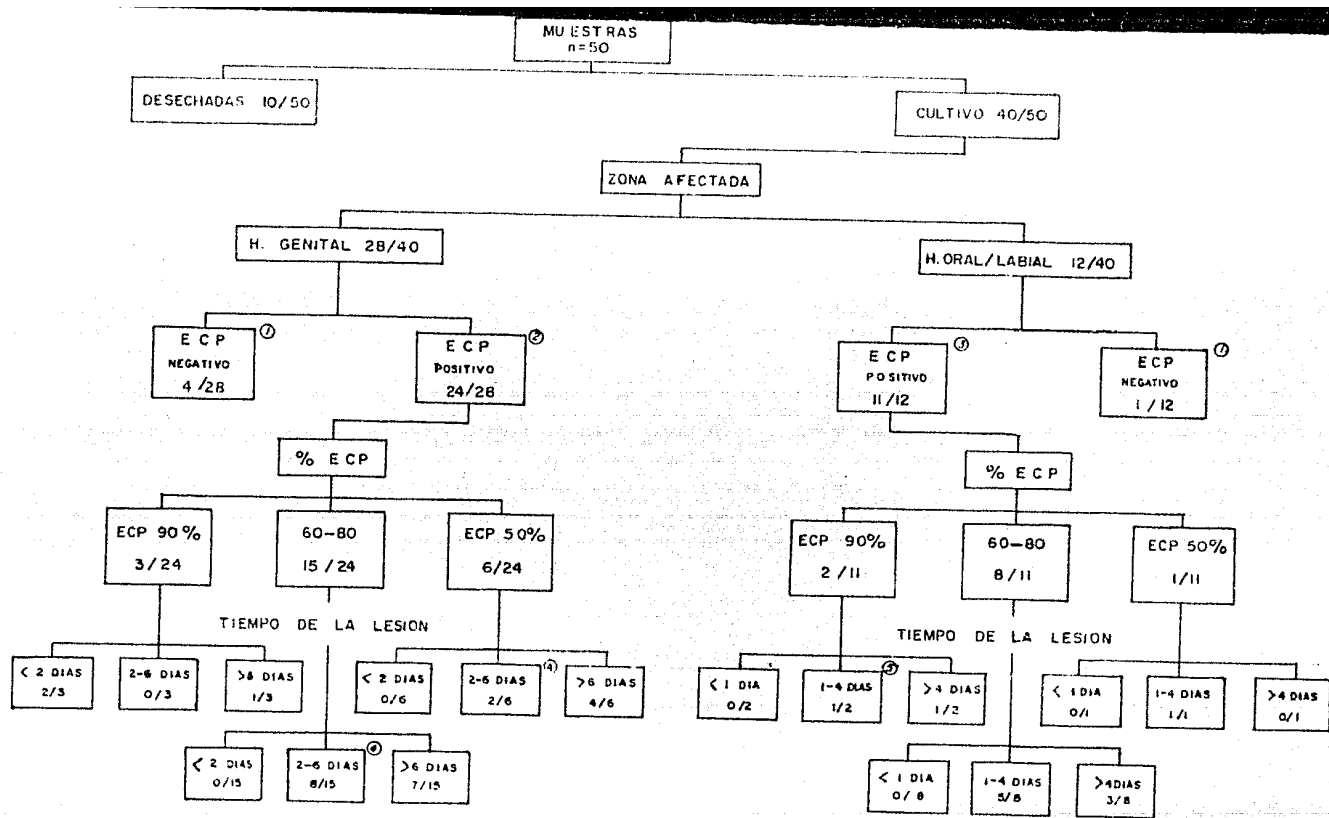
Se recolectaron 50 muestras de lesiones con características similares a las producidas por Herpes Simple; cada una de ellas por duplicado para utilizarla en la infección de células Vero y para determinar si la metodología de extracción podía ser aplicada en muestras directas, sin realizar la multiplicación del virus en cultivos celulares.

Las muestras directas se trataron de la siguiente forma, para observar si el método de digestión por enzimas de restricción podía ser aplicado de manera eficiente: la muestra se centrifugó a $115\ 000\ \text{xg}$ durante 2 horas a 4°C para bajar el virus; el medio se decanta y el botón se resuspende en Tris-EDTA, se trata con SDS/proteinasa K y se extrae con fenol; finalmente, se precipita con etanol y acetato de sodio. El material así obtenido se digirió con BamHI y se realizó la separación de los fragmentos por electroforesis como ya se ha descrito.

En ningún caso de todas las muestras tratadas se obtuvo un patrón electroforético determinado. Se realizó la cuantificación de partículas infecciosas en tres de las muestras directas, dando títulos de 5×10^3 , 7×10^2 , y 10^4 ufp/muestra.

Diez de las cincuenta muestras se contaminaron (como se observa en la Figura 6); con cada una de las cuarenta restantes se infectó una cantidad de células equivalente a 75 ó 150 cm^2 de superficie (7.5×10^6 y 1.5×10^7 células respectivamente). Se observaron las células infectadas continuamente cada 12 hr aproximadamente durante 5 días como máximo y, éstas se recolectaron para realizar el método de extracción cuando presentaron un ecp mayor o igual al 50%, pero evitando que llegaran a lisarse para utilizar el DNA viral intracelular.

Un total de 35 muestras dieron un ecp semejante al producido por HSV. En



- ① TODAS LAS MUESTRAS PROVENIENTES DE LESIONES DE MAS DE 15 DIAS
- ② 23/24 TOMADAS DE ULCERAS/COSTRA; 1/24, DE VESICULA.
- ③ 8/11 TOMADAS DE ULCERAS/COSTRA; LAS DEMAS DE VESICULAS.
- ④ LAS MUESTRAS TITULADAS TUVIERON UN TITULO MENOR DE 10^4 UFP/MUESTRA
- ⑤ MUESTRA POSITIVA PARA PATRON DE RESTRICCIÓN CON BAM HI.

la Figura 6 se agrupan los datos obtenidos, relacionando %ecp con el tiempo de la lesión de la cual proviene cada una de las muestras. Todos los datos incluidos en esa Figura están considerando solamente el primer pase del virus en células; sin embargo, a algunas cepas se les dió un segundo pase y dos de ellas no produjeron ecp, mientras que otras dos si dieron un ecp muy claro.

El título de las dos muestras que si dieron ecp en los dos pases fué de 2×10^3 ufp/ml y de 6×10^5 ufp/ml en el pase 1 y, de 10^6 ufp/ml y 10^5 ufp/ml en el pase 2, respectivamente.

En base a los resultados obtenidos previamente con las cepas VR-3 y MP, se estableció el uso del método Pignatti para tratar las células infectadas con las muestras. Para ello, se seleccionaron las células que tenían un ecp semejante al de HSV mayor o igual del 50% (en cinco días como máximo), pero evitando que las células se lisaran. El resultado fué que sólo en una de las muestras se observa un patrón electroforético apenas reconocible como HSV-1 y en algunas otras muestras, fragmentos de elevado peso molecular. La muestra reconocible como HSV-1 provenía de una lesión vesicular de herpes labial con dos días de aparición y dió un ecp de 100% en 48 hr.

En la Figura 7 están anotados algunos datos relacionados con algunas de las muestras positivas por ecp como son tiempo de la lesión y título de virus en el lisado despues de un pase por células. La máxima cantidad de virus obtenido despues de un primer pase en cultivos celulares fué de 5×10^5 ufp/ml con dos muestras que provenian de lesiones con 3 y 7 días de aparecida, respectivamente.

Nótese que existen aislados que provienen de lesiones con más de 20 días de aparición, lo cual dificulta de alguna forma el cultivo del virus en el

TIEMPO DE LA
LESION (DIAS)

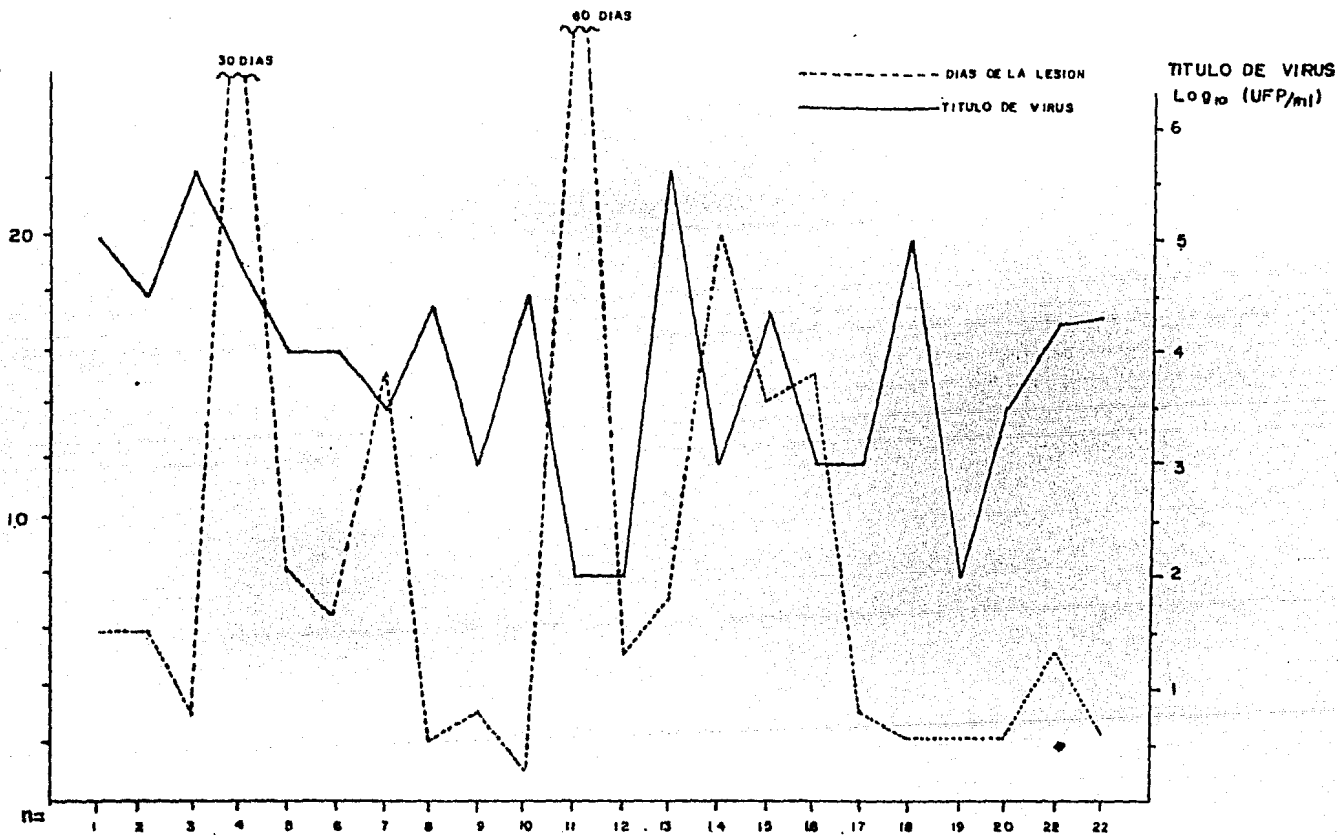


Figura 7. TITULO DE VIRUS Y TIEMPO DE LA LESION
LA CUANTIFICACION DE VIRUS SE REALIZO EN EL PRI-
MER PASE POR CULTIVOS CELULARES (N ES EL No. DE
LA MUESTRA)

laboratorio. A pesar de que 5 de estas muestras no dieron ecp (Figura 6), hubo algunas que sí contenían virus infeccioso y por lo tanto se pudieron cultivar en células; en este sentido, se presume que el paciente presenta problemas de tipo inmunológico, aunque no se sabe con certeza el estado general de salud del individuo, ya que existe virus infeccioso después de 20 días, lo que normalmente no ocurre.

VI. DISCUSION.

Las condiciones de crecimiento y multiplicación del virus Herpes Simple se establecieron con cepas control, básicamente con las cepas MP y VR-3 (McIntyre) de HSV-1. Estas cepas fueron propagadas y mantenidas en cultivos celulares estacionarios y se determinó el efecto de la temperatura y la MOI en el rendimiento del virus. Se determinó que un buen rendimiento de partículas virales se obtenía a elevada MOI (mayor de 1), siempre y cuando, ésta no se mantuviera en pases consecutivos, debido a que se provoca la formación de partículas defectuosas (17, 21), que tienen, entre otras propiedades, la capacidad de interferir en la infección de partículas virales "normales" (17) con la consecuente disminución en el rendimiento.

Por otro lado, se determinó que la temperatura de incubación (34 ó 37°C) a que se someten las células después de la infección no influye en la producción y liberación del virus al medio extracelular; esto está más bien influenciado por la MOI y por el tiempo de incubación. Así, se muestra en el experimento 8 que existe la misma cantidad de partículas infecciosas en el medio extracelular y en el lisado, es decir, que la cantidad de partículas infecciosas en la fracción celular del lisado es despreciable infectando a una MOI de 3 e incubando 48 horas.

El establecimiento de las condiciones óptimas de multiplicación y cuantificación de las cepas control del virus HSV-1 permitió conocer el sistema biológico con el cual se estaba trabajando y nos llevo a considerar factores de importancia en nuestro trabajo, como: la inactivación del virus por almacenamiento por tiempos prolongados, factor que tiene que considerarse en los títulos que se obtienen ya trabajando con muestras clínicas; otro ejemplo de ello sería la optimización del rendimiento del DNA viral, evitando la lisis celular

que conlleva la pérdida de éste, contenido en la fracción celular del lisado.

Con respecto a las metodologías de extracción de DNA viral utilizadas, nos encontramos con la necesidad de cuantificarlo. Utilizando la lectura de Densidad óptica a 260 nm resultó que el rendimiento de material extraído (ácidos nucleicos en general), era muy alto, hasta 180 ug por 1.5×10^7 células, a pesar de lo cual no se producía un patrón de restricción característico de DNA viral por lo que fue necesario establecer el origen del DNA extraído y cuantificarlo.

Utilizando gradientes de CsCl a equilibrio, se detectó la presencia de dos tipos de DNA capaces de resolverse en dos bandas. Se estableció la presencia de DNA viral en el extracto debido a que se realizó un ensayo de infectividad con cada una de las bandas del gradiente. Asimismo, se realizaron digestiones con enzimas de restricción (EcoRI y HindIII) de las distintas fracciones del gradiente, estableciéndose que la banda de mayor densidad correspondía al DNA viral, la otra se consideró de origen celular. Este resultado puede explicarse considerando que el DNA de HSV contiene una alta proporción de G-C, lo que hace que su densidad sea mayor que la del DNA celular (27, 52).

En los gradientes de CsCl se observaron varios aspectos que resultaron de interés: uno de ellos fué que la cantidad de DNA viral obtenida en el extracto estaba en función directa con la cantidad de partículas presentes en el lisado; es decir, que entre mayor cantidad de partículas había en el lisado, se obtenía más DNA viral en el extracto; sin embargo, en algunas ocasiones (específicamente, con títulos menores de 10^3 ufp/ml) no se observó DNA viral, seguramente por la sensibilidad de la tinción con bromuro de etidio en CsCl (la mínima cantidad de DNA observable es de 500 ng aproximadamente).

Los gradientes sirvieron, además, para determinar que ninguno de los métodos de extracción es selectivo para DNA viral, ya que también se obtiene DNA celular, aunque por comparación con el material obtenido después del tratamiento de las células con SDS/proteasa se supo que con los métodos descritos por Arens (1) y Pignatti (38) se extrae preferentemente DNA viral pero también hay pérdida de éste durante el proceso. Muchas veces, sobre todo cuando había títulos bajos de virus, la cantidad de DNA celular era mucho mayor que la de DNA viral, lo cual explica que, en los experimentos iniciales, aunque se obtenía una cantidad de DNA excesiva determinada por Densidad óptica, predominaba el DNA celular de manera que no se veían patrones de restricción, solamente un barrido intenso después de la digestión.

La utilización de la precipitación de virus con PEG previo a la extracción del DNA, demostró que hay una gran pérdida de partículas en ese proceso (aproximadamente $2 \log_{10}$), lo cual se verificó por gradientes de CsCl, en donde se comparó la cantidad de DNA viral antes y después de la precipitación con PEG. Esta pérdida se observó porque sólo aparecía la banda correspondiente al DNA celular después de la precipitación (verificado por enzimas de restricción); lógicamente, la pérdida de DNA no solamente se debe al DNA contenido en partículas infecciosas sino también al que aún no está ensamblado y al que está formando parte de partículas no infecciosas.

Al obtenerse resultados variables en las digestiones con enzimas de restricción (EcoRI y Hind III) se introdujo como control de dichas digestiones el DNA del fago lambda: éste se usó como control interno, adicionándolo al material extraído y precipitado, lo cual permitiría detectar la presencia de un inhibidor enzimático en el extracto celular y también se utilizó como control de la reacción de digestión, es decir, digiriendo por separado DNA de lambda.

Está reportado que en algunos casos el RNA actúa como inhibidor de ciertas enzimas de restricción, por lo que el extracto se trató con RNAsa antes de la precipitación con etanol. Posteriormente se eliminó el tratamiento con RNAsa debido a que la enzima BamHI funcionó bien en presencia de RNA; además, se supo que éste podía facilitar la precipitación del DNA actuando como molécula acarreadora (la mínima cantidad precipitable de DNA es $10 \mu\text{g/ml}$).

Uno de los objetivos principales del proyecto era que el método de tipificación pudiera ser sencillo y aplicable en un laboratorio de diagnóstico. Esta sencillez estaba basada, entre otras cosas, en las condiciones de electroforesis para lo cual, se usaba un gel de agarosa horizontal de 11 cm de longitud; en éste, sin embargo, la mayoría de los fragmentos producidos por la digestión del DNA de HSV-1 con EcoRI y Hind III (6 y 9 fragmentos respectivamente con pesos moleculares superiores a 7×10^6 D), no podían ser separados. Los geles de agarosa presentaban, además, un problema de sensibilidad en la detección de los fragmentos: podían ser teñidos con bromuro de etidio con el que se detectaban 20 ng de DNA por banda. Este último problema se resolvió al estandarizar una técnica de tinción con Nitrato de plata (42) con el cual la sensibilidad incrementaba hasta la detección de 2.5 ng de DNA por banda (algunas veces se detectó hasta 1 ng) pero los fragmentos de pesos moleculares mayores de 7×10^6 no lograron separarse.

Los geles de poliacrilamida tienen una ventaja sobre los de agarosa, la sensibilidad, pudiendo detectarse cantidades de DNA hasta de 0.5 ng por tinción con Nitrato de plata, aunque no puede separar fragmentos de DNA con pesos moleculares superiores a 7.6×10^6 daltones. Debido a ello decidimos cambiar nuestras condiciones de electroforesis a geles de poliacrilamida pero utilizando una enzima que rindiera fragmentos pequeños a partir del DNA de HSV y que ade-

más pudiera discriminar HSV-1 de HSV-2 (10, 51); esta enzima es BamHI (produce 39 fragmentos con pesos moleculares que varían entre 3.5×10^5 a 7×10^6 D), aunque existen otras como HpaI, KpnI, PstI, Sall, XhoI (51) pero presentan algunos inconvenientes, sobre todo de costos.

En el experimento 16 están descritas las condiciones de extracción por las que se obtiene un patrón de restricción de HSV-1 con BamHI, observable en geles de poliacrilamida con Nitrato de plata. Esto como se indicó antes, requiere de una cantidad inicial de 4.3×10^8 partículas infecciosas presentes en la fracción celular del lisado, lo cual equivale a 48 ng de DNA (16). La cantidad de DNA inicial, en realidad, es mayor porque aquí no consideramos el DNA presente en la célula que no ha sido ensamblado y por lo tanto no podemos cuantificar, pero es de suponer que existe una proporción casi constante de partículas infecciosas y de DNA no ensamblado (29).

Una vez establecidas las condiciones por las que se obtenían patrones de restricción en geles de poliacrilamida con las cepas control, trató de aplicarse esta metodología en la tipificación de virus provenientes de lesiones genitales y orales.

Se había determinado que eran necesarias 4.3×10^8 partículas infecciosas para observar patrones de restricción y por otro lado, se sabía que existen 10^9 a 10^{10} partículas virales por ml de líquido vesicular (47) y que puede haber hasta 10^8 partículas virales infecciosas en una lesión de herpes labial recurrente (48). Todos estos datos nos indujeron a pensar que podría obtenerse un patrón de restricción en una muestra directa, sin multiplicar el virus en cultivos celulares, lo cual sería mucho más práctico para el diagnóstico; sin embargo, como se mencionó en los resultados, en ningún caso de todas las muestras tratadas directamente se obtuvo un patrón de restricción visible por tin-

ción con nitrato de plata, a pesar de que muchas de ellas provenían de lesiones muy severas. Las muestras tituladas reflejan que había una cantidad muy baja de virus en ellas ($< 10^4$ ufp/muestra).

La cantidad de virus en la lesión está muy relacionada con el tiempo que tiene ésta, al momento de tomar la muestra (48, 50). La mayoría de las muestras (41/50) fueron recolectadas después del tercer día de aparecida la lesión y solamente 4 de ellas estaban en estado vesicular, estado en el que existe la mayor cantidad de virus (11, 48, 50); a medida que avanza el tiempo de la lesión, la cantidad de virus disminuye, lo cual explica por qué hay poca cantidad de virus y, por lo tanto, la ausencia de patrones de restricción después de la digestión.

La multiplicación del virus en cultivos celulares no fue lo suficientemente efectiva para producir la cantidad de virus requerida en la observación de patrones de restricción con nitrato de plata porque en ninguna de todas las muestras se alcanzó el título de virus requerido; el título más alto alcanzado fue 6×10^5 ufp/ml. A algunas de las muestras se les dio un segundo pase en células para observar si el título incrementaba y realizar así la digestión con BamHI: 2 muestras no dieron ecp en el segundo pase; el título en una de ellas incrementó de 10^3 a 10^5 ufp/ml y en otra, se mantuvo en aproximadamente 10^5 ufp/ml.

Han sido reportados algunos casos de infecciones genitales por el virus de Molusco contagioso (VCM) en donde en un primer pase por células existe un ecp claro y en pases sucesivos desaparece el ecp (13) porque el virus no puede mantenerse en cultivos celulares. Esto pudo haber ocurrido con las dos muestras que no dieron ecp al segundo pase. En lo referente a las otras muestras, se observa que el título puede permanecer estable en pases consecutivos o puede in-

crementar a un cierto pase. Esta inseguridad provoca que el método de tipificación descrito en el presente trabajo no sea confiable en cuanto a rapidez pero puede aplicarse satisfactoriamente cuando existe un buen rendimiento de partículas virales. Puede ser de utilidad, por lo tanto, en aquellos casos en que no urge conocer el resultado, por ejemplo, en estudios epidemiológicos ya que, como se ha mencionado, pueden distinguirse cepas relacionadas.

Algunos de los reportes que proponen a las enzimas de restricción como método de tipificación han utilizado radioisótopos (7, 10, 30) para detectar los fragmentos resultantes de la digestión, con lo cual pueden detectarse cantidades del orden de 10^{-12} g ; sin embargo el uso de radioisótopos es poco conveniente para el diagnóstico en un laboratorio clínico. Por otro lado, también se ha utilizado bromuro de etidio para detectar dichos fragmentos (1), pero no sabemos la cantidad de virus y por lo tanto, la cantidad de DNA mínimo necesario para detectar los fragmentos por esa tinción, ya que en todos los reportes hacen pases consecutivos del virus en cultivos celulares antes de hacer el análisis por enzimas de restricción y no reportan títulos virales.

A lo largo del trabajo pudieron detectarse algunos problemas que no fueron previstos durante el diseño del mismo que impidieron que éste se desarrollara de la mejor manera. Un problema lo es el alto índice de contaminación (20% de las muestras), y aunque la toma de la muestra no se realizó en condiciones asepticas, este problema parece ser debido principalmente a la falta de medidas higiénicas por parte del enfermo. Otro problema es el tiempo que tiene la lesión cuando el paciente se presenta a consulta, provocando con ello la dificultad de cultivar el virus por la baja cantidad de partículas virales presentes en la lesión.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Arens, MQ., EM, Swierkosz, Simplified Method for typing Herpes Simplex virus by Restriction Endonuclease Analysis. J Clin Microbiol, 17: 548-551 (1983).
2. Baringer, JR, P. Swoveland, Recovery of Herpes Simplex virus from Human Trigeminal Ganglions. N Engl J Med, 288: 648-650 (1973).
3. Baringer, JR, Recovery of Herpes Simplex virus from Human Sacral Ganglions. N Engl J Med, 291: 828-830 (1974).
4. Becker, TM, et al., Genital Herpes Infections in Private Practice in the United States, 1966 to 1981. JAMA, 253: 1601-1603 (1985).
5. Blyth, WA, et al., Reactivation of Herpes Simplex Virus infection by ultraviolet light and possible involvement of prostaglandins. J Gen Virol, 33: 547-550 (1976).
6. Brautigam, AR., et al., Rapid Typing of HSV isolates by DNA:DNA Hybridization. J Clin Microbiol, 12: 226-234 (1980).
7. Buchman, TG., et al., Restriction Endonuclease fingerprinting of Herpes Simplex virus DNA: a novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. J Infect Dis, 138: 488-498 (1978).
8. Buchman, TG., et al., The Structure of Herpes Simplex Virus DNA and its application to molecular epidemiology. Ann N Y Acad Sci, 354: 279-290 (1980)

9. Chaney, M.J., et al., Variable restriction endonuclease sites of HSV type 1 isolates from Encephalitic, Facial and Genital Lesions and ganglia. J Gen Virol, 64: 2717-2733 (1983).
10. Chaney, M.J., et al., A comparative analysis of restriction enzyme digests of the DNA of HSV isolated from genital and facial lesions. J Gen Virol 64: 357-371 (1983).
11. Chang, Te-Wen, et al., Genital Herpes. Some Clinical and Laboratory Observations. JAMA, 229: 544-545 (1974).
12. Chien Liu, Nonbacterial Pharyngitis in "Infectious Diseases", Paul H. Hoeprich eds, Harper and Row Publishers, Maryland, 1972, pp 250-255.
13. Dennis, J., et al., Molluscum contagiosum, Another Sexually Transmitted Disease: Its impact on the Clinical Virology Laboratory. J Infect Dis. 151: 276 (1985).
14. Douglas, GR., RB. Couch, A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in humans. J Immunol, 104: 289-295 (1970).
15. Ejercito, PM., et al., Characterization of Herpes Simplex Virus Strains Differing in their Effects on social behaviour of Infected Cells. J Gen Virol, 2: 357-364 (1968).
16. Fasman, GD. Ed. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed., Nucleic Acids Volume 2, CRC Press, Cleveland, 1975, pp 310

17. Frenkel, N., et al., Anatomy of Herpes Simplex DNA III. Characterization of Defective DNA Molecules and Biological Properties of Virus Populations containing them. J Virol, 16: 153-167 (1975).

18. Goodheart, CR., Nucleic Acid Hybridization and the relationship between Cervical cancer and Herpes Simplex Virus type 2. Canc Res, 33: 1548-1551 (1973).

19. Graham, FL, AJ. Van Der Eb, A new Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. Virology, 52: 456-467 (1973).

20. Hayward, GS., et al., Anatomy of Herpes Simplex Virus DNA: strain differences and heterogeneity in the locations of restriction endonuclease cleavage sites. Proc Natl Acad Sci, USA 72: 1768-1772 (1975).

21. Hennes-Stegman, B., CH Schröder, Low Infectivity of HSV-1 DNA caused by Defective-interfering Genomes. J Gen Virol, 63: 307-314 (1982).

22. Hoggan, MD., B. Roizman, The Isolation and Properties of a variant Herpes Simplex producing Multinucleated Giant cells in Monolayer Culture in the presence of antibody. Am J Hyg, 70: 208-219 (1959).

23. Honess, RW., B. Roizman, Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade regulation of the Synthesis of three groups of viral proteins. J Virol, 14: 8-19 (1974).

24. Kaplan, AS., A Brief Review of the Biochemistry of Herpes Virus-Host Cell interactions. Canc Res, 33: 1393-1398 (1973).

25. Keller, JM., et al., Proteins specified by HSV. III. Viruses differing in their effects on the social behaviour of infected cells specify different membrane glycoproteins. Proc Nat Acad Sci, USA 65: 865-871 (1970).

26. Keller, JM., The expression of the *syn* gene of HSV-1 I. Morphology of Infected Cells. Virology, 69: 490-499 (1976).

27. Kieff, A., Size, Composition and Structure of the Deoxyribonucleic Acid of Herpes Simplex Virus Subtypes 1 and 2. J Virol, 8: 125-132 (1971).

28. Klein, RJ., The Pathogenesis of Acute, Latent and Recurrent Herpes Simplex Virus Infections. Arch Virol, 72: 143-168 (1982).

29. Kuchler, R., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology. Dowden Hutchinson and Ross Inc., Stroudsburg, Pennsylvania, 1977, pp 178-

30. Lonsdale, DM., A Rapid Technique for distinguishing Herpes Simplex Virus type 1 from type 2 by restriction enzyme technology. Lancet i: 849-852 (1979).

31. Mandel, GL., RG. Douglas, JE. Bennett, Principles and Practice of Infectious Diseases, 2 vols., John Wiley I Sons, New York, 1979, pp 466-480, 1009-1018, 1268-1269, 1469, 1770.

32. Manservigi, R., et al., Cell fusion induced by HSV is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. Proc Nat Acad Sci, USA 74: 3913-3917 (1977).

33. Nahmias, A., B. Roizman, Infections with Herpes Simplex Virus 1 and 2. N Engl J Med, 289: 667-674, 781-789 (1973).

34. Nahmias, A.J., W.E. Josey, Epidemiology of Herpes Simplex Virus 1 and 2 in "Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control". Evans, SA ed. Plenum Medical Book Company, N York, 1976, pp 253-271.

35. Norrild, B., et al., Accumulation of Herpes Simplex Virus type 1 Glycoprotein D in Adhesion Areas of Infected Cells. J Gen Virol, 64: 2499-2503 (1983).

36. Overall, J.C., Dermatologic Viral Diseases. Chapter 7 in "Antiviral Agents and Viral Diseases of Man" edited by G.J. Galasso et al., Raven Press, N York, 1984, pp 247-312.

37. Overall, J.C., Genital and Perinatal Herpes Simplex Virus Infections in "International Symposium on Medical Virology" edited by LM. de la Maza, Franklin Institute Press. In Press, 1985.

38. Pignatti, P., et al., Herpes Simplex Virus DNA Isolation from Infected Cells with a Novel Procedure. Virology, 93: 260-264 (1979).

39. Plummer, G., Serological comparisons of the herpes viruses. Brit J Exp Pathol, 45: 135-141 (1964).

40. Plummer, G., et al., Comparative Studies of type 1 and type 2 herpes simplex virus. Brit J Exp Pathol, 49: 202-208 (1968).

41. Plummer, G., et al., Type 1 and type 2 HSV: Serological and Biological differences. J Virol, 5: 51-59 (1970).

42. Porro, M., et al., Ultrasensitive silver-stain Method for the detection of Proteins in Polyacrilamide Gels and Immunoprecipitates on Agarose Gels. Anal Biochem, 127: 316-321 (1982).

43. Portnoy, J., et al., Recovery of Epstein-Barr Virus from Genital Ulcers. N Engl J Med, 311: 966-968 (1984).
44. Ratner, J.J., K.O. Smith, Serum antibodies to HSV type 1 during active oral herpes infection. Infect Immun, 27: 113-117 (1980).
45. Rawls, W.E., et al., An analysis of Seropidemiological Studies of herpes virus type 2 and carcinoma de cervix. Canc Res, 33: 1477-1482 (1973).
46. Reeves, W.C., et al., Risk of recurrent after first episode of genital herpes. Relation to HSV type and antibody response. N Engl J Med, 305: 315-319 (1981).
47. Smith, K.O., J.L. Melnick, Recognition and Quantitation of Herpesvirus particles in Human vesicular lesions. Science, 137: 543-544 (1962).
48. Spruance, S.L., et al., The Natural History of Recurrent Herpes Simplex Labialis. Implications for Antiviral Therapy. N Engl J Med, 297:69-75 (1977).
49. Stalhandske, P., U. Petterson, Identification of DNA viruses by membrane Filters Hybridization. J Clin Microbiol, 15: 744-747 (1982).
50. Stanberry, L.R., et al., Genital herpes in guinea pigs: Pathogenesis of the Primary infections and Description of Recurrent Disease. J Infec Dis, 148: 337-404 (1982).
51. Ueno, T., et al., A Simple and Practical Method for typing and Strain Differentiation of Herpes Simplex Virus using Infected Cells DNA. Microbiol Immunol, 26: 1159-1170 (1982).

52. Walboomers, JM., JT. Schegget, A new method for the isolation of HSV-2 DNA. Virology, 74: 256-258 (1976).
53. Whitley, RJ., et al. The Natural History of Herpes Simplex virus infection of mother and newborn. Pediatrics, 66: 489-494 (1980).
54. Whitley, RJ., et al., Infections caused by Herpes Simplex Virus in the Immunocompromised Host: Natural History and topical Acyclovir therapy. J Infect Dis, 150: 323-329 (1984).
55. Zheng, K., et al., Comparison of Biological, Biochemical, Immunological and Immunochemical Techniques for typing HSV Isolates. J Clin Microbiol, 17: 396-399 (1983).