

61



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"CINETICA DE PRODUCCION DE ANTIGENOS Y
ESTANDARIZACION DE UN WESTERN BLOT
PARA EL VIRUS HERPES SIMPLE."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
PAULA SERVIN VILLA

28/1/95

ASESOR: O.F.B. ROBERTO VAZQUEZ CAMPUZANO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A MÍ MAMÁ:

*Por todo su amor, comprensión y apoyo
incondicional que me ha brindado a
lo largo de toda mi vida.*

A MI PAPÁ:

*Por trasmitirme siempre ese espíritu
de superación y lucha en la vida y por
haberme dado la oportunidad de realizar mis metas.*

A MIS PADRES:

*Por luchar junto conmigo para alcanzar todas
mis metas y alentarme para continuar preparandome.*

A LA MEMORIA DE MI ABUELITA TRINI.

A MIS HERMANOS:

Juan Carlos, Armando, Jorge, Roberto, Alberto,
Ignacio y en especial a mis hermanas: Vero y Patty
por todo su cariño y apoyo brindado durante toda mi vida.

A ROBERTO:

Por brindarme siempre su amor y confianza
en todo momento.

A MIS CUÑADOS :

(Cesar, Leonel, Patty, Julieta, Katia, Tania y en especial
a Adriana por brindarme su apoyo y cariño).

A MIS AMIGAS:

En especial a Deysi, Laura, Lauriestela, Pili,
Jeny, Blanca Estela, Sandra y Araceli por
compartir conmigo el invaluable tesoro de la
amistad y recorrer conmigo el camino de la vida.

A MIS AMIGOS:

Carlos, Paco, Dani, L. Alejandro,
Pepe, Ivan, Luis Alberto y Ernesto.

A TODOS MIS SOBRINOS.

Y en especial a DIOS :

Por permitirme estar aquí y
avanzar día a día por el camino de la vida.

A MI DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. Roberto Vázquez Campuzano,
por todo su apoyo prestado para la
realización de este proyecto.

Agradezco a todo el personal de los departamentos de ETS, Virología, y Rotavirus del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. INDRE, por todo el apoyo, asesoramiento y facilidades que me otorgaron durante el desarrollo de este trabajo

A mí Jurado:

M.V.Z Gerardo Cruz Jiménez.
Q.B.P. Judith Martínez Zamitis.
M.V.Z. Angel Martínez Sosa.
Dr. Víctor Zendejas Buitrón.

RESUMEN

La Inmunolectrotransferencia (IET), es una metodología que presenta una gran especificidad, por lo cual puede ser usada como prueba definitiva para el diagnóstico del Virus Herpes Simple tipos 1 y 2. La importancia de implementar esta técnica, se debe a la reactividad cruzada que presentan los antígenos de ambos serotipos, por lo cual es muy difícil establecer el tipo de virus infectante, sin embargo con esta técnica, a través de la glicoproteína G2 (gG-2), se realiza la identificación de cada subtipo.

Para poder establecer el serotipo infectante mediante el método de (IET), inicialmente se establecieron cultivos celulares para la propagación del virus, los cuales se evaluaron mediante la técnica de inmunofluorescencia directa para confirmar que el efecto citopático (ECP), observado fuera realmente ocasionado por la infección con el VHS tipo 1 y 2 respectivamente, además se estableció la cinética de infección viral. Una vez obtenido un lote suficiente de virus, se realizó la purificación de los antígenos virales mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y su posterior separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), para el posterior desarrollo de la técnica de Inmunolectrotransferencia.

También se analizó si existe reactividad cruzada con antígenos del virus Epstein Barr y Citomegalovirus en un grupo de sueros de pacientes con la sintomatología característica, ya que estos virus pertenecen a la misma familia *Herpesviridae*.

Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta lo siguiente: la ausencia de bandas o si estas son muy tenues y no corresponden a las del control positivo, se consideraron seronegativas al VHS. Los resultados seropositivos al VHS se determinaron con la presencia de bandas, las cuales concuerden con el control positivo. En este trabajo se logró identificar el subtipo del VHS asociado al proceso infeccioso, sin embargo la resolución de la banda de la glicoproteína G2 (gG2), fue muy débil, lo cual dificultó un poco la tipificación de los sueros analizados.

ABREVIATURAS.

ADN.- Acido desoxiribonucleico

CMV.- Citomegalovirus

HVEM.- Mediador de entrada del virus Herpes.

EB.- Epstein – Barr

ECP.- Efecto citopático

IET.- Inmunoelctrotransferencia.

IgG.- Inmunoglobulina clase G

IgM.- Inmunoglobulina clase M

Kda.- Kilo Daltons

MHC.- Complejo principal de Histocompatibilidad.

PBS.- Amortiguador salina-fosfatos.

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa.

PVC.- Penciclovir.

R/N.- Recien nacido

TIF α .- Factor inductor de la transcripción de genes tempranos.

VIH.- Virus de la inmunodeficiencia humana

VHS.- Virus Herpes simple

INDICE GENERAL

	Pags.
1 Generalidades de la familia herpesviridae.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Descripción del virus herpes simple.....	2
1.3 Propiedades biológicas de las glicoproteínas del VHS.....	6
1.4 Ciclo de replicación del VHS.....	9
1.5 La respuesta inmune del VHS.....	9
1.6 Características clínicas de la infección.....	10
1.7 Espectro clínico de la infección.....	14
1.8 Métodos de diagnóstico.....	17
1.9 Tratamiento y prevención de las infecciones por VHS.....	20
2 Justificación del proyecto de tesis	22
3 Objetivos.....	23
4 Material y Métodos.....	24
4.1 Material biológico.....	24
4.2 Reactivos.....	24
4.3 Material de laboratorio.....	25
4.4 Equipo.....	26
4.5 Metodología.....	27
5 Resultados.....	34
6 Discusión.....	47
7 Conclusiones.....	49
8 Apéndices.....	50
9 Bibliografía.....	55

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

	pags.
Cuadro 1 Taxonomía de la familia <i>Herpesviridae</i>	1
Cuadro 2 Terapia con acyclovir en las infecciones por el VHS.....	20
Cuadro 3 Cinética de crecimiento del VHS por IF.....	35
Cuadro 4 Relación del cuadro clínico con el Dx. Por ELISA e IET con antígeno del VHS-1.....	38
Cuadro 5 Relación del cuadro clínico con el Dx. Por ELISA e IET con antígeno del VHS-1.....	40
Cuadro 6 Comparación del PM experimenta obtenido por laIET y el reportado en la bibliografía para el VHS.....	42
Cuadro 7 Bandas comunes entre EB y CMV con el VHS.....	46

FIGURAS:

Figura 1. Representación de la forma geométrica del VHS.....	3
Figura 2. Tinción negativa del VHS.....	3
Figura 3. Representación estructural del VHS.....	4
Figura 4. Esquematización de los "picos" que forman las gP en la envoltura viral.....	8
Figura 5. Envoltura del VHS.....	8
Figura 6. Patogenia del VHS.....	12
Figura 7. Fotografía de una lesión oro-labial.....	14
Figura 8 Electroforesis de los dos purificados antigenicos.....	36
Figura 9 Electroforesis e IET del sobrenadante de células sin infectar.....	37
Figura 10 Curva de calibración de los marcadores de peso molecular.....	43
Figura 11 IET del VHS-1 revelado con sueros de pacientes positivos al VHS.....	44

Figura 12 IET del VHS-1 revelado con sueros positivos al virus EB 44

Figura 13. IET del VHS-2revelado con sueros de pacientes positivos al VHS..... 45

Figura 14. IET del VHS-2revelado con sueros de pacientes positivos a CMV y EB..... 45

1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA *HERPESVIRIDAE*.

La familia *herpesviridae* se encuentra altamente diseminada en la naturaleza y en las especies animales la cual esta constituida por una variedad de agentes, de los cuales por lo menos 8 afectan al hombre, los cuales han sido agrupados dentro de tres subfamilias: *alfaviridae*, *betaviridae* y *gamaviridae* de acuerdo a sus propiedades biológicas tales como; la arquitectura del virion (centro el cual contiene la doble cadena de DNA lineal, cápside icosaédrica de aproximadamente 100-300 nm de diámetro esta variabilidad depende del tegumento de cada especie; el cual es un material amorfo y la envoltura la cual presenta picos de glicoproteínas virales en la superficie). La clasificación de los herpesvirus que afectan al hombre se presenta en el cuadro 1. (8,19)

Cuadro 1. Clasificación de la familia Herpesviridae.(19)

FAMILIA	SUBFAMILIA	GENERO	ESPECIES
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alfa-herpes virus</i>	Simplexvirus	Virus herpes humano tipo 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2) Virus herpes B (Virus Herpes simiae)
		Varicelovirus	Virus Herpes humano 3 (Varicela-zoster virus)
	<i>Beta-herpes virus</i>	Citomegalovirus	Virus Herpes humano 5 (Citomegalovirus)
		Roseolovirus	Virus Herpes humano 6 (Virus humano linfotrópico B) Virus Herpes humano 7
	<i>Gama-herpes virus</i>	Linfocriptovirus	Virus Herpes humano 4 (Epstein Barr)
		Rhadinovirus	Virus Herpes humano 8 (Asociado al Sarcoma de Kaposi)

1.1 ANTECEDENTES.

Las infecciones primarias ocasionadas por el Virus del herpes simple tipo 1 y tipo 2 (VHS-1 y VHS-2), son principalmente oro-labiales y genitales. El Médico Francés John Astruc describe al herpes genital desde 1736; en el Siglo XIX se demostró que los fluidos de lesiones oro-labiales infectaban a otros humanos. En 1923 Goodpasture postuló que el agente causal del herpes oro-labial podía establecer una infección latente; Cushing especula que el VHS se encuentra latente en las células de ganglios neuronales. A principios de 1960 Schneeweis, Dowdle y Nahmias reportan que el VHS puede ser dividido por pruebas de neutralización en dos tipos, por lo tanto los subtipos se asocian con el tipo antigénico y con el sitio de infección viral. (6)

1.2 DESCRIPCIÓN DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE.

La partícula viral del VHS mide 180- 200 nm de diámetro, de forma icosaédrica siendo un virus que presenta envoltura trilaminar la cual es derivada de la membrana del núcleo de la célula infectada la cual tiene la función de mediar la adsorción y la penetración del virus a la célula. Su genoma esta formado por DNA de doble cadena lineal, el cual se encuentra contenido en el centro de una cápside icosaédrica formada por 162 cápsómeros. Su DNA tiene un P.M de 96×10^6 KDa. (Figura 1, 2, 3)

Figura 1. Representación esquemática de la forma geométrica del VHS. (44)

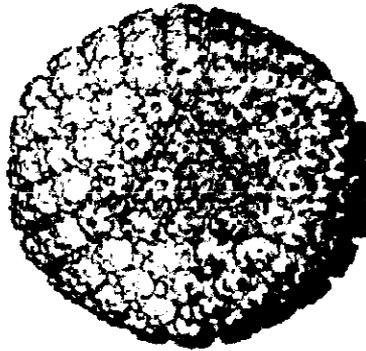
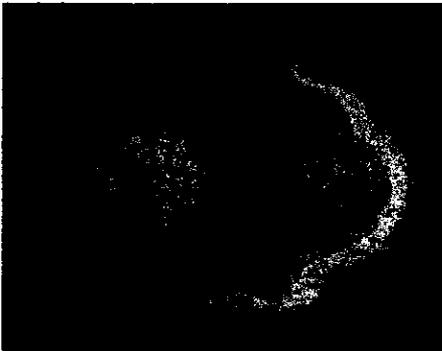


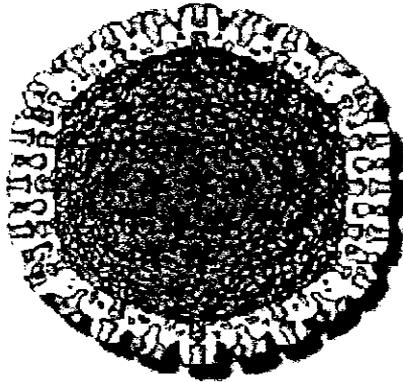
Figura 2. Tinción negativa del VHS. (44)



Quando la envoltura del virus se rompe y colapsa deja fuera la cápside presenta una típica apariencia de "huevo frito". Micrografía tomada en Microscopio electrónico.

Figura 3. Representación esquemática de la estructura del VHS. (44)

Herpesvirus Corte Transversal



Envoltura: presenta glicoproteínas asociadas.

Tegumento: es una región llena de proteínas entre capsido y envoltura.

Capsido: con forma icosaédrica, de 95 a 105 nm de diámetro y 162 capsómeros hexagonales

El genoma del VHS-1 codifica para más de 70 polipéptidos, el cual puede tener cuatro isoformas dependiendo de la orientación de dos componentes designados L (largo) y S (corto). Cada componente consiste de un brazo con una secuencia única de repeticiones invertidas. El componente L abarca el 82% del DNA viral y consiste de una única secuencia llamada "U", flanqueada por una *región inversa repetitiva* denominadas: ab y b'a' cada cual incluye un 6% del DNA viral. El componente S abarca el 18% del DNA viral y también tiene una secuencia llamada "Us", flanqueada por una *región inversa repetitiva* denominadas: a'c' y ca incluyendo cada una un 4.3 % del DNA viral. La inversión de las secuencias relativas de L y S son derivadas de recombinaciones en sitios específicos mediados por un gen viral; producto directo de la región terminal "a".

Estudios de hibridación de DNA de los VHS-1 y 2 muestran un 50% de homología en su DNA. Ambos subtipos (VHS tipo 1 y tipo 2), comparten una proteína de 140-Kda, la cual tiene actividad intrínseca de cinasa. (21, 37, 39)

Dentro de las diferencias biológicas de los VHS-1 y VHS-2 se encuentra su capacidad para propagarse, sus características citopáticas, su tamaño en la formación de placas en ciertos sistemas de cultivos celulares, sin embargo la más grande diferencia es que las infecciones oro-faciales predominantemente son causadas por el VHS-1 y el herpes genital lo ocasiona principalmente el VHS-2, aunque pueden llegar a causar ambos el otro tipo de infección. El VHS-2 es capaz de establecer una infección latente en el ganglio sacro y la reactivación directa del virus puede causar un episodio recurrente clínico o subclínico. Se ha observado en individuos que presentan anticuerpos para el VHS-1 una disminución en la severidad de las manifestaciones clínicas cuando son infectados por el VHS-2 (27, 28, 39).

La identificación del VHS-1 y 2 se logra a través de su reactividad con anticuerpos neutralizantes dirigidos contra antígenos determinados que posee el virión en su envoltura. Estos anticuerpos no se detectan por métodos serológicos clásicos. Ambos serotipos presentan algunos antígenos homólogos por lo cual no se pueden diferenciar entre uno y otro tipo, debido a su reactividad cruzada.

Particularmente debido a que el 80% de la población adulta en general presenta anticuerpos contra el VHS-1 (27).

1.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS GLICOPROTEÍNAS DEL VHS.

El VHS presenta diez glicoproteínas en su envoltura viral, las cuales se denominan: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, algunos autores mencionan una décimo primera denominada gJ. A continuación se describen algunas de sus propiedades biológicas: (8,41)

- gB. Esta glicoproteína es necesaria para el proceso de fusión del virus con la membrana celular. A través de un modelo con VHS-1 con una mutación en el residuo 633 de cisteína, se encontró que esta glicoproteína está involucrada en la transportación del virión a la superficie celular, además de incorporar la envoltura a la nucleocápside y al tegumento. En otro estudio se demostró que una secuencia rica en lisina en esta gB se une al receptor de sulfato de heparina, favoreciendo la entrada y diseminación lateral entre una célula y otra, sin embargo, no es absolutamente necesario para la infección viral, ya que existen otros mecanismos de entrada a la célula (15,16).
- gC, gD, gE están involucradas en el proceso de adsorción.
- gD; es la glicoproteína más potente para inducir anticuerpos neutralizantes. En estudios recientes se ha descrito que la gD es el principal mediador de la unión con el HVEM (mediador de entrada para los herpes virus in vitro); el cual es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. (25) Aunque no es la única glicoproteína que se une al HVEM, ya que las glicoproteínas: gB, gD, gH, y gL (las cuales son esenciales para la entrada del virus), también pueden estar involucradas con este receptor para mediar la unión célula – virus (4, 33, 40).
- gC se une a la fracción C3b del complemento, también está involucrada en la adsorción viral a la célula a través del receptor de sulfato de heparina.(10)

- gG es un antígeno específico de tipo, para el herpes simple, por lo tanto, por medio de esta glicoproteína es posible realizar la distinción entre VHS-1 y VHS-2. **(38)**
- gI tiene la misma actividad que la gE. En un estudio reciente se encontró, mediante el uso de un modelo con un VHS-1 mutante que no expresaba la gE y la gI, que estas glicoproteínas funcionan como receptores para la Fc de las inmunoglobulinas clase G (IgG), se demostró también, que los mutantes eran avirulentos, quizás porque estas dos glicoproteínas también están involucradas en la diseminación célula a célula de la infección *in vitro*. Lo anterior dio como conclusión, que la función que ejercen la gE y la gI como receptores para la Fc de las IgG, es evadir el ataque de los anticuerpos contra el virus. Explicando así, porque los anticuerpos son relativamente ineficaces en las infecciones por el VHS. **(23)**.
- La gH y la gL forman un complejo (gH-gL) que estimula la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo cual son buenos inmunógenos; en diversos estudios se ha encontrado que este complejo es esencial para la fusión y penetración del virus a la célula **(26)**.
- La gK esta involucrada en la liberación del virus, pero no se requiere para su entrada a la célula, teniendo así una función muy importante en el ciclo de replicación **(14)**.

Figura 4. Representación esquemática de las “proyecciones” que forman las glicoproteínas en la envoltura viral. (44)

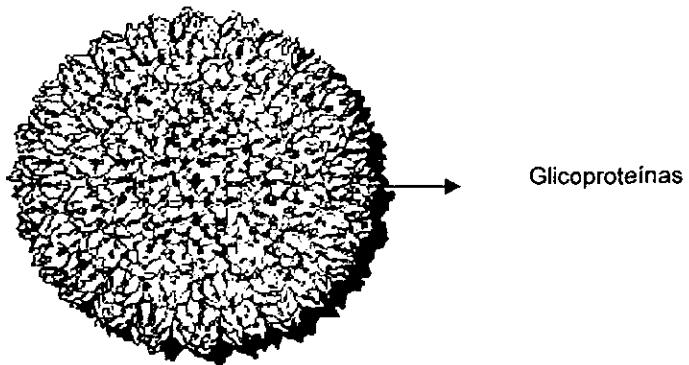


Figura 5. Micrografía de la envoltura del VHS. (43)



La envoltura que rodea la nucleocápside es derivada de la membrana nuclear de la célula infectada del hospedero y las glicoproteínas codificadas por el virus son incorporadas dentro de la envoltura viral y se observan como “proyecciones” que se proyectan de la superficie

“proyecciones”

1.4 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS HERPES SIMPLE.

El primer paso en el ciclo de replicación es la adhesión del virión a la superficie de la célula mediante su envoltura intacta. Seguido por la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula, la cápside posteriormente se dirige al núcleo, en donde se da la liberación del DNA, en donde este se replica y aproximadamente 50 polipéptidos son producidos en la célula infectada. Varios polipéptidos no estructurales que regulan funciones en el virus son producidos en el ciclo temprano de infección (3-4 hrs.) Las proteínas estructurales se producen aproximadamente entre las 3-4 hrs post-infección. La nucleocápside es ensamblada en el núcleo, después de la adición de residuos de carbohidratos que son incorporados dentro de la membrana nuclear de la célula hospedera ya que estos polipéptidos constituyen la envoltura viral. La fase de eclipse de infección con VHS es el tiempo de infección hasta que la nueva progenie aparece siendo de 6-8 hrs y la producción de virus continúa hasta la muerte de la célula hospedera (31, 39).

1.5 LA RESPUESTA INMUNE PARA EL VHS.

En el desarrollo temprano de lesiones recurrentes causadas por el VHS, las células predominantes en el infiltrado celular que se forma alrededor de las células infectadas, son los macrófagos y los linfocitos CD4 y CD8. Un estudio reciente, comprobó que los mejores marcadores antigénicos para los linfocitos T CD4 y CD8, son las glicoproteínas: gB, gC, gD y gH. Utilizando un modelo de queratinocitos pretratados con IFN γ los cuales fueron infectados con la vacuna de vaccinia que expresaba glicoproteínas recombinantes del virus herpes simple (VvgB, VvgC, VvgD o VvgH), se encontró que las glicoproteínas del VHS fueron expresadas en los antígenos HLA-DR (inducidas por el IFN γ) en los queratinocitos (20).

Como ya se mencionó anteriormente, las glicoproteínas gE y gI del VHS tienen la capacidad de funcionar como receptores de la Fc de las IgG. Pero también se ha encontrado que los herpes virus tienen la capacidad de interferir con los componentes de complemento, a través de la gC mediante la incorporación de proteínas reguladoras de este sistema dentro de la envoltura del virus o membrana celular, o bien por la expresión de moléculas que mimetizan las funciones de estas proteínas reguladoras, además se une al componente C3 inhibiendo la lisis de células infectadas mediada por la cascada del complemento in vitro. (17,18). En diversos estudios se ha comprobado que el VHS-1 tiene la capacidad de bloquear la señal de apoptosis mediante el bloqueo de los genes α -4 y US-3 los cuales codifican para las principales proteínas reguladoras de la muerte programada en las células infectadas inducida por los linfocitos T citotóxicos; mediante el uso de modelos con cultivos celulares infectados con VHS-1, en los cuales al adicionar agentes inductores de apoptosis tales como: el TNF α , anticuerpos dirigidos hacia el receptor Fas, C2-ceramida, así como el desafío de las células a choques osmóticos (sorbitol) y térmicos, se inhiben las manifestaciones nucleares de la apoptosis. Se puede señalar que los virus de CMV y EB los cuales son miembros de la familia *Herpesviridae* inhiben la expresión de las moléculas del MHC sobre las membranas de células infectadas por lo que se puede proponer que el VHS también utilice este mecanismo como una estrategia efectiva de evasión a la respuesta inmune. (9, 12).

1.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN.

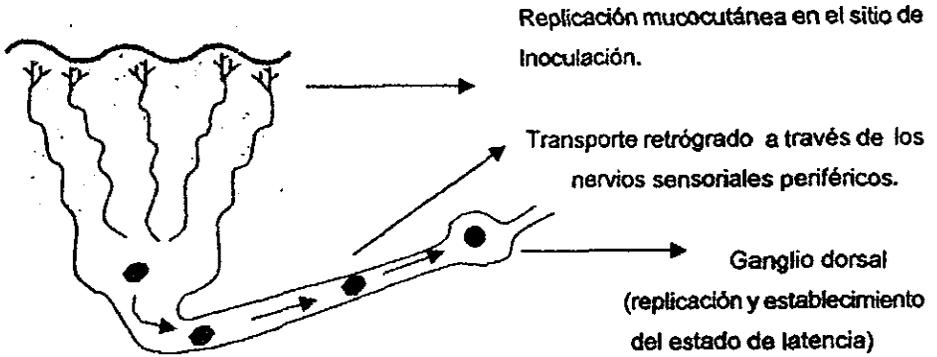
Las manifestaciones clínicas y el curso de la infección por VHS dependen del sitio anatómico de la infección, la edad y el estado inmunológico del hospedero así como el tropismo que presente el virus infectante.

Las infecciones por el virus del Herpes son de tipo persistente, ya que el virus escapa de la respuesta inmunológica del hospedero porque se introduce en las terminaciones nerviosas y de ahí se transporta hacia el núcleo de las neuronas sensoriales en el ganglio trigémino o en el ganglio sacro, estableciendo así el estado de latencia.

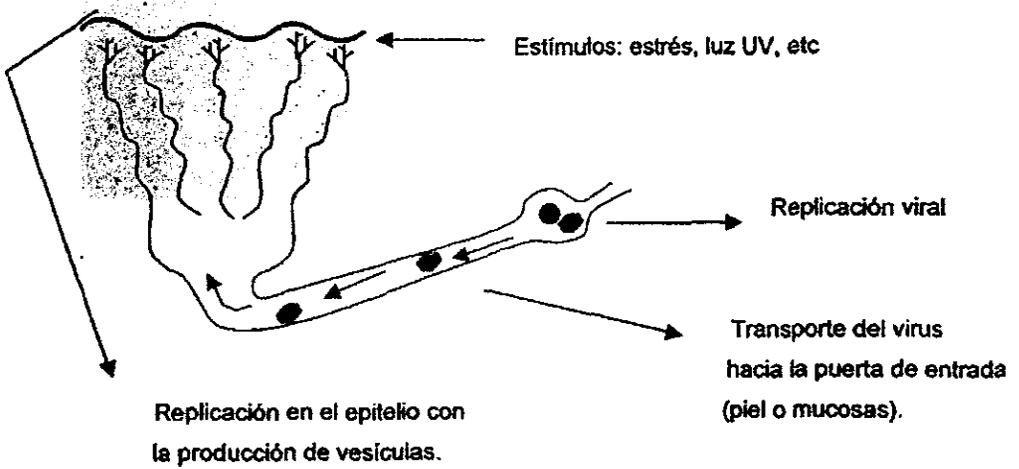
La infección inicial por el VHS-1 ocurre frecuentemente durante la infancia, manifestándose como una gingivostomatitis. En un 50% de los individuos infectados el virus permanece latente, sin expresar sus funciones replicativas de por vida. En el 40 a 50 % de los individuos infectados restantes la replicación viral inicia aproximadamente a los 120 días post-infección. Las neuronas actúan como células semipermisibles, es decir, que solo bajo ciertas circunstancias permite la replicación viral. Se han postulado algunos mecanismos que las neuronas sensoriales efectúan para regular la expresión de los genes virales inmediatamente después de que el virus entró a la célula, dentro de los cuales se mencionan que; a) En el hospedero existe el factor Oct1 que esta asociado con el TIF α (factor inductor de la transcripción) para la activación de los genes alfa (genes asociados en la replicación viral), y este factor solo se expresa en las neuronas, bajo ciertas condiciones. Lo cual conduce a la reactivación de la infección en el ganglio trigémino para el VHS-1 o en el ganglio sacro para el VHS-2, causando la liberación de partículas virales en la parte vecinal al sitio de entrada, produciendo así una lesión superficial en piel o mucosa donde ocurrió la lesión original lo cual se representa en la figura 1 (29, 30, 37, 39)

Figura 6. Patogenia del virus herpes simple.

a)



b)



- Piel o mucosa (puerta de entrada).
- Virus Herpes simple
- Neurona

El período de incubación del VHS es de 1-26 días (6-8 días en promedio), el contacto con la lesión ulcerada o con excreciones virales en períodos asintomáticos ocasiona su diseminación a otros sitios anatómicos así como también la transmisión a otros individuos.

Ambos subtipos virales, como ya se menciona ocasionan infecciones oro-labiales y genitales. Sin embargo la infección por VHS-2 en genitales es de 8-10 veces más frecuente que la causada por VHS-1 y de manera inversa la infección por VHS-1 oro-labial es 10 veces mayor que la causada por el VHS-2 en el mismo sitio; cabe mencionar que existe una alta prevalencia de infecciones por el VHS-2 en mujeres con carcinoma cervical **(37,39)**.

En un estudio epidemiológico realizado en los Estados Unidos, en un grupo de jóvenes entre 12 –22 años de edad, se encontró que la prevalencia de la infección por el VHS-1 es de 62%, mientras que la producida por el VHS-2 es del 12%. En el mismo estudio también se analizó la relación que existe entre la raza y la susceptibilidad a la infección por el VHS, encontrándose que para las infecciones por el VHS-1, la raza no es significativa, mientras que para el tipo-2, la prevalencia fue mayor en los Afro-americanos. Con relación al sexo de los individuos se observó más la infección por el VHS-2 en mujeres. **(33)**. Estudios recientes muestran que la presencia de anticuerpos contra el VHS-1 reduce el riesgo de adquirir la infección con el VHS-2, debido al cruce antigénico entre ambos tipos **(11, 37)**.

El diagnóstico de la infección primaria en un individuo con VHS-1 o VHS-2 puede ser establecida por la demostración de una seroconversión o de la elevación del título de anticuerpos entre un suero de fase aguda y convaleciente (sueros pareados). Sin embargo únicamente el 5% de los pacientes con infecciones mucocutáneas recurrentes del VHS tienen una elevación significativa de los anticuerpos específicos entre la fase aguda y convaleciente. Debido a lo anterior es preferible la utilización de ensayos de captura para inmunoglobulinas clase M (IgM). Este tipo de anticuerpos son producidos durante la etapa aguda y en las reactivaciones del VHS, por lo cual su detección es útil en todas las etapas de la infección.

1.7 ESPECTRO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL VHS.

Los Virus Herpes Simple pueden producir infección en diferentes niveles:

l) Oro-labiales.

a)Gingivoestomatitis.- Son lesiones extensas vesicoulcerativas de la mucosa oral.

b)Faringitis

c)Herpes labiales (esta lesión es causada por la reactivación del virus en las neuronas sensoriales regionales).

Figura 7. Fotografía de una lesión oro-labial causada por el VHS. (43)



II) Herpes Genital.- Estas infecciones son generalmente adquiridas por contacto sexual con una persona infectada, la cual puede presentar las características propias de la infección, o ser asintomático.

- a) Infección en cervix y uretra.
- b) Endometritis y salpingitis
- c) Prostatitis.
- d) Infecciones perianales y rectales.

III) Infecciones Oculares

- a) Queratitis
- b) Conjuntivitis
- c) Querato-conjuntivitis.- Se presentan como úlceras en la cornea y/o vesículas en los párpados, incluso si no se da un tratamiento adecuado llega a ocasionar ceguera.

IV) Infecciones del sistema nervioso central

Encefalitis (generalmente producida por la reactivación del VHS-1 o por reinfección con el VHS-2)

V) Otras infecciones (generalmente debida a que se presenta una viremia; por lo cual el virus puede diseminarse a otros órganos) en:

- a) Esófago
- b) Intestino
- c) Hígado
- d) Pulmones
- e) Hígado

VI) Infecciones Neonatales : Se presentan generalmente cuando el bebé atraviesa el canal de parto y su madre presenta una infección genital causada por el VHS. Ocasionando daños neurológicos irreversibles al bebé (Encefalitis).

VII) Infecciones durante el embarazo: Estas infecciones pueden diseminarse y ser peligrosas tanto para la madre como para el feto. Este tipo de infecciones es poco frecuente y generalmente están asociadas a la infección primaria por el VHS en el tercer trimestre de embarazo.

VIII) Infecciones cutáneas. **(5)**

IX) Infecciones en pacientes con SIDA. Estos individuos presentan una disminución en su respuesta inmunológica ocasionada por el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), por lo cual no son capaces de desencadenar una respuesta inmune eficiente para combatir la infección por el VHS. **(42)**.

1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Existen varias técnicas de laboratorio para identificar la infección producida por el VHS. En ellas es posible identificar los antígenos o el DNA del VHS, o los anticuerpos producidos en respuesta a la infección. Los métodos más utilizados son los siguientes:

a) Métodos directos. Los métodos directos nos permiten identificar al virus, a sus antígenos o a su genoma:

- Aislamiento del VHS en cultivo celular.
- Microscopía electrónica.
- Microscopía óptica a través de tinciones celulares. (cambios histológicos)
- Inmunofluorescencia directa.
- Hibridación del DNA del VHS
- Ensayos Biológicos (inoculación en animales).
- Análisis de restricción de endonucleasas.

b) Métodos indirectos. Este tipo de ensayos nos permiten determinar la presencia de anticuerpos contra el virus:

- Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).
- Hemaglutinación.
- Radioinmunoensayo (RIA).
- Fijación de complemento.
- Pruebas de citotoxicidad
- Slot blot
- Inmunoelctrotransferencia

El aislamiento en cultivo celular se considera como el método estándar de oro en el laboratorio para confirmar la infección por el VHS. Por medio de este método

es posible observar el efecto citopático (ECP) producido por el virus, el cual puede ser discernible en una gran variedad de sistemas de cultivo disponibles como las líneas celulares: Vero, Hep-2, BGM, HeLa, entre otras. El (ECP) puede ser identificado entre 24-96 hrs después de la inoculación. **(14)**

Actualmente se han realizado diferentes estudios comparativos entre los métodos de diagnóstico para el VHS, obteniéndose los siguientes resultados: Se ha reportado que la técnica de ELISA tiene un 97.5% de sensibilidad y un 98.6% de especificidad con respecto al aislamiento viral en cultivo celular, por lo cual es la técnica más utilizada para el diagnóstico de rutina del VHS, teniendo como desventaja que no es posible diferenciar entre el VHS-1 y el VHS-2. En esta técnica, es posible detectar anticuerpos (IgM), los cuales aparecen más tempranamente en el curso de la infección y permanecen detectables hasta por 8 semanas. **(3,37,41)**.

En otro estudio se realizó la comparación entre tres métodos para detectar la infección genital causada por el VHS en una población con un cuadro clínico característico. Los métodos comparados fueron:

- i) Detección de antígenos del VHS por ensayo inmunoenzimático (EIA),
- ii) Aislamiento del VHS en cultivo de células Vero.
- iii) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- El aislamiento en cultivo tuvo un 80.9% de sensibilidad y un 100% de especificidad comparado con la técnica de PCR.

- El EIA, obtuvo un 65.2% de sensibilidad y un 98.7% de especificidad comparado con PCR.

- El EIA, tuvo un 80.7% de sensibilidad y un 99% de especificidad comparado con el aislamiento en cultivo celular.

Con base a estos resultados se puede decir que la PCR resultó ser más sensible y específica que el aislamiento en cultivo celular, aunque como se mencionó anteriormente este último es considerado como el método estándar de laboratorio, para confirmar la infección por el VHS. Este trabajo fue el primero en comparar la PCR con otras dos metodologías de laboratorio (37).

En la última década se han tratado de implementar nuevas metodologías, así como de optimizar las ya existentes con la finalidad de diferenciar entre los dos serotipos del VHS, debido a que existe un gran interés epidemiológico por conocer cual serotipo es el que predomina en las diferentes infecciones producidas por este virus. La mayoría de estas metodologías se basa en la identificación de las glicoproteínas del VHS, principalmente de la gG. Como el inmunoensayo enzimático basado en la gG (gG- EIA) el cual fue comparado con la Inmunoelectrotransferencia obteniéndose para el EIA del VHS-1 un 95% de sensibilidad y un 96% de especificidad y para el VHS-2 un 98% de sensibilidad y un 97% de especificidad (1)

1.9 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS INFECCIONES POR EL VHS.

El tratamiento estándar de elección es el acyclovir (9-(2-hidroxi-etoximetil) guanina), el cual es un análogo del nucleósido de guanosina (purina), su mecanismo de acción es el siguiente: el fármaco es fosforilado por la Timidin cinasa del virus formando un compuesto monofosforilado el cual va a ser fosforilado dos veces más por enzimas celulares quedando como Trifosfato de desoxiguanosina (compuesto activo). Este compuesto se intercala por las guanosinas del DNA inhibiendo así la replicación del virus.

Cuadro 2. Indicaciones para la terapia con acyclovir en infecciones por el VHS (42).

Tipo de infección	Vía de administración y Dosis.	Comentarios
<u>Genital</u>		
Episodio inicial	-200 mg/ 5 veces al día Durante 10 días. -5 mg/Kg IV c/8 hr durante 5 días -Tópico al 5% c/ 6 hr. Durante 7 días	Reservado a casos severos Menor efectividad que la terapia oral.
Episodio recurrente	-200 mg/ 5 veces al día Durante 5 días	
<i>Supresión</i>	-400 mg dos veces al día	
<u>Mucocutáneas en pacientes inmuno-comprometidos</u>		
	-200-400 mg 5 veces al día durante 10 días -5 mg/Kg IV c/ 8 hr; de 7-10 días	
<u>Encefalitis</u>	-10 mg/Kg IV c/ 8 hr, durante 10-14 días	Terapia alternativa: vidarabina, valaciclovir o famciclovir.
<u>Neonatales</u>	-10 mg/Kg IV c/ 8 hr, durante 10-14 días	Terapia alternativa: vidarabina, valaciclovir o famciclovir.

Otro tratamiento que también es usado es el Penciclovir (PCV) el cual es tan eficaz como el aciclovir en el tratamiento del primer episodio del herpes genital, siendo la dosis recomendada de 250 mg tres veces al día durante cinco días. Además, PCV alarga el periodo libre de recurrencias sintomáticas en el herpes genital. PCV es el primer antivirico que ha demostrado eficacia en todos los síntomas del herpes genital recurrente. PCV logra mayor persistencia en las células infectadas por el virus herpético, lo cual se traduce en menos dosis diaria y más comodidad frente al antivirico tradicional. PCV posee un excelente perfil de seguridad similar a aciclovir y placebo, es compatible con otros tratamientos, y los alimentos no alteran la biodisponibilidad del fármaco. (42)

PREVENCIÓN.

En los últimos años se ha intentado producir una vacuna para el VHS, para lo cual se ha construido un plásmido el cual contiene genes que codifican para las glicoproteínas C, D y E. Este tipo de vacuna se probó inoculando ratones por vía intramuscular, desafiándolos posteriormente con 4 UFP del VHS-1 vía intraperitoneal. Con este esquema se obtuvo cierta protección frente a la infección. Encontrándose que esta vacuna no brindó una total protección a los ratones vacunados. En este trabajo, al analizar los anticuerpos inducidos por el plásmido, se encontró que la respuesta inmune humoral predominante es por IgG2 (24).

2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS

En la última década se han tratado de implementar nuevas metodologías, así como de optimizar las ya existentes con la finalidad de diferenciar entre los dos serotipos del VHS, debido al gran interés epidemiológico por conocer que serotipo es el que prevalece en las diferentes infecciones ocasionadas por el VHS. La mayoría de estas se basa en el uso de glicoproteínas del VHS, principalmente de la gG-2 como el inmunoensayo enzimático basado en la gG (gG- EIA) el cual fue comparado con la Inmunolectrotransferencia obteniéndose para el VHS-1 un 95% de sensibilidad y un 96% de especificidad y para el VHS-2 un 98% de sensibilidad y un 97% de especificidad. En un futuro se podría implementar un método de purificación específico para la gG-2 para mejorar así la resolución de este antígeno en la (IET). (1)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar y estandarizar el método de Inmunolectrotransferencia para la detección de anticuerpos contra el Virus Herpes Simple, como alternativa para identificar el tipo de virus asociado a síndromes clínicos particulares.

3.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

3.1.1.1 Determinar la cinética de crecimiento y producción de antígenos del virus del herpes simple, en células de mono verde de Búfalo (BGM).

3.1.1.2 Evaluar comparativamente la eficiencia en la obtención de antígenos del virus del herpes simple, a través de dos métodos de purificación: *gradiente de sacarosa* y precipitación con Polietilenglicol.

3.1.1.3 Determinar la existencia de reactividad cruzada del VHS frente a otros miembros de la familia Herpesviridae, Citomegalovirus (CMV) y virus Epstein Bar (VEB).

3.1.1.4 Establecer si la técnica de IET es útil para diferenciar entre el VHS tipo 1 y el VHS tipo2.

4 MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Células BGM
- Virus herpes simple tipo 1
- Virus herpes simple tipo 2
- Suero Fetal Bovino al 10% (GIBCO)

4.2 REACTIVOS

4.2.1 Cultivo Celular

Medio MEM en SSB de Earle. (GIBCO)

Bicarbonato de sodio al 4.4% (GIBCO)

HEPES 1 M (Microlab)

Penicilina-Estreptomicina (10,000 UI-10,000 mg) (Sigma)

Tripsina-Verseno (EDTA) 0.05% (Sigma)

4.2.2 Reactivos para inmunofluorescencia.

- Equipo Pathfinder. Kallestad diagnostics (BioMerieux) No. cat. 620

-Anticuerpos monoclonales murinos para el VHS-1 y 2, conjugado con fluoresceína.

*La preparación de estas soluciones se describe en el apéndice.

4.2.3 Soluciones para la electroforesis

TEMED (0.005%)

Bis-Acrilamida

Tris 0.5 M, pH 6.8

Tris 1.5 M, pH 8.8

Tris 0.05 M, pH 7.2

SDS 10%

Persulfato de amonio 10%

Amortiguador de muestra (tris-base 0.5M pH 6.8, SDS, glicerol, dithiothertol, azul de bromofenol, agua destilada)

Amortiguador de lisis (tris-base 0.05 M pH 7.2, NaCl, SDS, tritón, PMSF).

Amortiguador de corrida (glicina, tris-base, SDS).

4.2.4 Soluciones para le transferencia

PBS pH 7.0

Amortiguador de transferencia 10X, pH 7.0

4.2.5 Inmunodetección.

Solución bloqueadora con albumina sérica bovina al 3% en PBS pH 7.0

Amortiguador de lavado (PBS pH 7.0 - Twen 20 al 0.02%)

Amortiguador de dilución (PBS pH 7.0 - albumina1% - 0.02% Twen 20)

Anticuerpos anti-inmunoglobulina humana de cabra. (American Life Science)

Complejo biotina-peroxidasa. (American Life Science)

3-3' - Diaminobencidina

4.3 MATERIAL DE LABORATORIO.

- Vasos de precipitado de 50,100,250,500, y 1000 ml.
- Pipetas de vidrio de 1,2,5,10, y 25 ml.
- Pipetas de plástico estériles de 2,5,10 y 25 ml.
- Botellas para cultivo de 75 cm² de superficie
- Gendarmes (scrappers)
- Probetas de 50,100, 250 y 1000 ml.
- Matraz aforado de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraz Kitasato de 125 y 250 ml.
- Tubos cónicos para centrifuga estériles de 15 y 50 ml.

- Criotubos con tapón de rosca de 2 ml.
- Tubos de polipropileno de 30 ml
- Embudo de vidrio
- Puntas desechables para pipetas automáticas.
- Barra magnética.
- Portaobjetos cubiertos de teflón, con pozos excavados
- 2 vidrios de 25 X 25 cm para la transferencia
- Papel de nitrocelulosa

4.4 EQUIPO

- Campana de flujo laminar vertical. (Alder)
- Incubadora (WWR Scientific Modelo 2200)
- Microscopio invertido
- Microscopio de epifluorescencia (OLIMPUS)
- Potenciometro
- Cámara de electroforesis miniprotean III completa
- Fuente de poder para cámara de electroforesis
- Micropipetas de volumen variable (5-50 μ l, 40-200 μ l)
- Centrífuga clínica
- Vortex
- Ultracentrífuga

4.5 METODOLÓGIA

4.5.1 CULTIVO CELULAR.

- 1.- Se preparó el medio MEM de acuerdo al número de botellas que se necesitarán (20 ml de MEM / Botella 75 cm²). Se suplemento con SFB al 10% y antibióticos al 1%.
- 2.- Se desechó el medio de la botella escogida para hacer el pase (monocapa confluyente), del lado contrario a las células.
- 3.- Se adicionaron 5 ml de tripsina al 0.05%, se lavó aproximadamente por 10 segundos y se desechó totalmente (Utilizar pipeta).
- 4.- Se adicionó 2 ml de Tripsina al 0.05% e incubó a 37° C durante y 5 min.
- 5.- Con golpecitos se bajaron las células y se adicionó 10 ml de MEM (Dispersando las células con un pipeteo suave).
- 6.- Se adicionó un volumen de suspensión celular de acuerdo al número de botellas requerido, adicionando después el MEM suplementado con 10% de SFB.
- 7.- Las botellas se revisaron diario hasta observar la monocapa confluyente.

4.5.2 PROPAGACIÓN DEL VHS TIPO 1 Y TIPO 2.

- 1.- Se les quitó el medio de crecimiento a 10 botellas de 75 cm² en las cuales la monocapa celular era confluyente.
- 2.- Fueron lavadas con medio de mantenimiento, para eliminar el SFB.
- 3.- Posteriormente son inoculadas con 1 ml de VHS (tipo 1 o tipo 2 según sea el caso).
- 4.- Se dejó 1 h en la incubadora a 37 °C para permitir la adsorción viral.
- 5.- Se agregó después el Medio de Mantenimiento: MEM con SFB 2%.
- 6.- Estas botellas fueron observadas diariamente de 5 a 7 días. Buscando observar el ECP característico de VHS.
- 7.- Se cosecharon cuando se observó el mayor ECP (44 hr), se separó por centrifugación el sobrenadante de las células. Se obtuvo un lote suficiente de ambos tipos de virus (VHS-1 y VHS-2).
- 8.- Se mantuvo en congelación a -70 °C.

4.5.3 TITULACIÓN VIRAL EN MICROPLACA.

Se utilizó una microplaca de 96 pozos y se realizó la titulación: células / ml.

- 1.- En criotubos estériles se realizaron diluciones logarítmicas de 10^{-1} a 10^{-8} del VHS-1 y 2 respectivamente a partir de 100 μ l del VHS tipo 1 o tipo 2.
- 2.- Con una micropipeta multicanales se adicionaron las diluciones del virus a la microplaca por pentuplicado.
- 3.- Posteriormente se adicionaron 100 μ l de una suspensión celular de BGM con una concentración de 200 000 células/ml.
- 4.- Finalmente se adicionaron 100 μ l de medio MEM con SFB al 2%.
- 5.- En una hilera se adicionaron 100 μ l de MEM con SFB 2% y 100 μ l de la suspensión celular de BGM a la concentración mencionada siendo mi control negativo.
- 6.- En otra hilera se adicionaron 100 μ l de VHS-1 más 100 μ l de la suspensión celular de BGM tomándola como control positivo.
- 7.- La placa se observa diariamente durante 5-7 días para observar cual fue la última dilución donde aparece el ECP. Calculándose el TCID₅₀/ ml.

4.5.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL VHS.

- 1.- Se obtuvieron 24 botellas de 25 cm² con células BGM confluentes.
- 2.- Se infectaron 11 botellas con VHS-1 y 11 con VHS-2 (la metodología fue descrita anteriormente).
- 3.- Se tomaron como controles negativos dos botellas de 25 cm² con células BGM sin infectar.
- 4.- De acuerdo al protocolo establecido se observaron al microscopio invertido las botellas infectadas a diferentes tiempos de post-infección y cosecharon.
- 5.- Se realizó IF a cada botella cosechada y se guardó a 4 °C protegidas de la luz.

4.5.5 INMUNOFLUORESCENCIA

- 1.-Una vez que se observó el máximo efecto citopático (ECP) en las células infectadas con el Virus Herpes simple Tipo 1 o tipo 2, fueron cosechadas, es decir son despegadas de la superficie de la botella con un gendarmen ("scraper").
- 2.-Posteriormente se homogenizó la suspensión celular por pipeteo suave.
- 3.-De esta suspensión se tomó 100µl y se mezcló con 100µl de medio MEM y de ahí se tomarón 20µl y se adicionarón en una laminilla con pozos.
- 4.-Se dejó secar en la campana de flujo laminar.
- 5.-Se fijó con acetona, dejando que se evapore.
- 6.-Se adicionó una gota de los anticuerpos monoclonales murinos para el VHS-1 y 2, conjugado con fluoresceina según sea el caso, en cámara húmeda durante 15 min.
- 7.-Se realizó dos lavados con PBS pH 7.0 de 15 min. cada uno.
- 8.-Se dejó secar, y se puso una gota de glicerol y se puso un cubreobjetos.
- 9.-Como control se realizó el mismo procedimiento a una botella de células BGM sin infectar.
- 10.-Por último se observarón las laminillas al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40 X.

4.5.6 PURIFICACIÓN ANTIGÉNICA DEL VHS.

Una vez obtenidas 10 botellas infectadas con VHS tipo 1 o 2, se prosiguió a purificar sus antígenos virales, comparando dos métodos; por gradiente de sacarosa y precipitación con polietilenglicol, comparándose a través de un corrimiento electroforetico en geles de poliacrilamida de los dos purificados y por medio de la tinción con azul de comassie se revelaron las proteínas virales.

4.5.6.1 A través de un gradiente de sacarosa al 20%

- 1.-10 botellas infectadas con VHS, se cosecharon cuando presento el mayor ECP; se separo por centrifugación el sobrenadante de las células.
- 2.-Se congelo el botón celular a -20°C .
- 3.-Al sobrenadante se le adiciono sacarosa al 20% esteril en una proporción de 3ml/ 25 ml de sobrenadante.
- 4.-Se centrifugo a 250000 rpm durante 1 h 30 min. (en tubos de policarbonato).
- 5.-Una vez finalizado la centrifugación se decanto perfectamente el sobrenadante de todos los tubos.
- 6.-Se agrego en frío la solución amortiguadora de lisis 1X, en proporción de 200 μl / 300 000 000 de células.
- 7.-Se agrego el amortiguador de muestra en la misma proporción, se alicoto en criotubos con pequeñas cantidades (200 μl c/u) y se congelo a -20°C hasta su utilización.

4.5.6.2 Utilizando Polietilen glicol 8000 al 8%

Se sigue el mismo procedimiento anterior, solo que se cambio la sacarosa por el Polietilenglicol 8000 al 8% y se dejo a 4°C durante 24h.

4.5.7 ELECTROFORESIS DEL PURIFICADO ANTIGENICO.

- 1.- Se desengrasaron con alcohol los vidrios y se ensamblaron al soporte.
- 2.-Se vertio el monómero al 12% lentamente 2 cm abajo del vidrio, evitando la formación de burbujas.
- 3.-Se cubrio la superficie del monómero con agua destilada (gota a gota, usando una pipeta Pasteur).
- 4.-Se dejo polimerizar durante 60 min.
- 5.-Se tiro el agua que cubrio el monómero y se seco con papel absorbente.
- 6.-Se preparo el gel superior. (concentrador al 4%)

- 7.-Se agregó de la misma manera que el primer gel.
- 8.-Se colocó el peine, evitando la formación de burbujas.
- 9.-Se dejó polimerizar durante 30 min.
- 10.-Se sacó el peine y se lavó dos veces con amortiguador de corrida y se secó con papel absorbente.
- 11.-Se prepararon las muestras y los marcadores de peso molecular (hervir 2-3 min).
- 12.-Se cargó el gel con las muestras, el cual previamente se colocó dentro de la cámara que lleva amortiguador de corrida.
- 13.-Se corrieron las muestras a 20 μ A para el gel concentrador y 30 μ A para el gel resolutor.
- 14.-Cuando el colorante salió del gel se desconectó de la fuente de poder y se sacaron los geles.
- 15.-Uno de los geles se tiñó con Azul de Coomassie durante 1 h. y después se destiñó con una solución de 25% de Metanol y 10% de Acido Acético hasta la aparición de bandas.
- 16.-Al otro gel se le realizó la transferencia.

4.5.8 TRANSFERENCIA PASIVA.

- 1.-Se cortaron las hojas de Nitrocelulosa y papel filtro de 8X9 cm.
 - Dos hojas de nitrocelulosa por gel.
 - Seis hojas de papel filtro
- 2.-Se remojaron en amortiguador de Transferencia 1X media hora antes.
- 3.-Se desmontaron los geles cuando se terminó el corrimiento, se hizo una muesca en el extremo inferior del gel.
- 4.-Se lavaron dos veces en amortiguador de transferencia, cada lavado se realizó durante 10 min de agitación.
- 5.-Se montó el sandwich:
 - Papel aluminio - Ega Pack - Vidrio - Tres hojas filtro - Nitrocelulosa - Gel - Nitrocelulosa -Tres hojas filtro- Vidrio.

Se envolvió con Ega Pack y con papel aluminio. Se puso peso para que se transfiriera durante dos días.

4.5.9 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

- 1.- Se llenó la hoja de registro de la Inmunoelectrotransferencia, anotando los sueros y controles que van a correrse.
- 2.-Se cortaron el número de tiras necesarias (3mm), numerarlas y colocarlas en charolas de corrimiento.
- 3.- Se añadió a cada canal 2.5 ml de solución amortiguadora de dilución
- 4.-Se añadieron 25 µl del suero del paciente al canal correspondiente.
- 5.- Se cubrió la charola y se incubó 1 h a 37 °C con agitación.
- 6.-Se preparó el anticuerpo anti-inmunoglobulinas hacia el final de la incubación 1: 1000 (Se preparó la cantidad necesaria). 2 ml por carril.
- 7.-Se aspiró con vacío el contenido de cada canal en un matraz desinfectante.
- 8.-Se lavó con amortiguador de lavado durante 5 min. Durante tres periodos.
- 9.-Se añadieron 2ml del anticuerpo anti-inmunoglobulina diluido 1: 1000.
- 10.-Se cubrió la charola e incubó 1 h a 37 °C con agitación.
- 11.-Se aspiró con vacío el contenido de cada canal en un matraz desinfectante.
- 12.-Se lavó con la solución amortiguadora de lavado, tres veces durante 5 min.
- 13.-Se preparó la dilución del complejo peroxidasa, dilución 1:500 (Se preparó la cantidad requerida).
- 14.-Se añadieron 2 ml del complejo peroxidasa en 2.5 ml de amortiguador de dilución por cada carril.
- 15.-Se cubrió la charola e incubó durante 1 h a 37 °C con agitación.
- 16.-Se aspiró con vacío el contenido de cada canal en un matraz desinfectante.
- 17.-Se lavó con amortiguador de lavado 3 veces durante 5 min.
- 18.-Se lavó una vez con PBS durante 5 min de agitación.
- 19.-Se preparó el reactivo de revelado: 3´3´-Diaminobencidina en la siguiente proporción 0.0125 g / 25 ml de PBS; Peróxido de hidrógeno al 30% en la siguiente proporción 30µl / 25 ml de PBS.

- 20.-Se añadió 2ml de reactivo de revelado a cada canal.
- 21.-Cuando aparecieron las bandas se lavó tres veces con agua destilada.
- 22.-Se secaron las tiras sobre papel filtro.

5 RESULTADOS.

Inicialmente para la propagación de los virus Herpes simple tipo 1 y tipo 2, se utilizaron tres líneas celulares: Vero, Hep-2 y BGM. Se eligió la línea celular BGM para la propagación del virus, debido a que el VHS se adaptó fácilmente a las células, obteniéndose en un tiempo más corto el efecto citopático (ECP; células gigantes multinucleadas) una vez adaptados los virus herpes simple tipos 1 y 2, se procedió a determinar su cinética de crecimiento a través de la observación del ECP en las células infectadas con el VHS tipo 1 y tipo 2 respectivamente a diferentes tiempos post-infección: 1,3,3.5,4,7,12,20.5,21.5,25,37 y 44 h y a la par se les realizó las inmunofluorescencias como mecanismo de control, para confirmar la observación referente a la presencia del efecto citopático; de este modo se identificó que conforme aumenta el tiempo post -infección va aumentando la inmunofluorescencia observada; estos resultados se muestran en el **Cuadro 3**. En el caso del ECP observado en las células infectadas a través del microscopio invertido solo se logró diferenciar la cinética hasta las 21 hrs post-infección en donde se comienzan a marcar los sincicios característicos gracias a la fusión de las membranas celulares ocasionado por el virus herpes simple, el mayor ECP se observa a las 44 hrs post-infección, tiempo en el cual se cosechan las botellas infectadas.

Cuadro 3. Cinética de crecimiento expresada en porcentajes por Inmunofluorescencia.

Horas post-infeccion	ECP observado por microscopía de luz		Inmunofluorescencia	
	%		%	
	VHS-1	VHS-2	VHS-1	VHS-2
1 h	0	0	15	0
3 h	0	0	25	10
3.5 h	0	0	50	60
4 h	0	0	30	30
7h	0	0	90	80
12 h	0	0	100	100
20.5 h	0	0	100	100
21.5 h	30	30	100	100
25 h	30	30	100	100
37	80	70	100	100
44 h	100	100	100	100

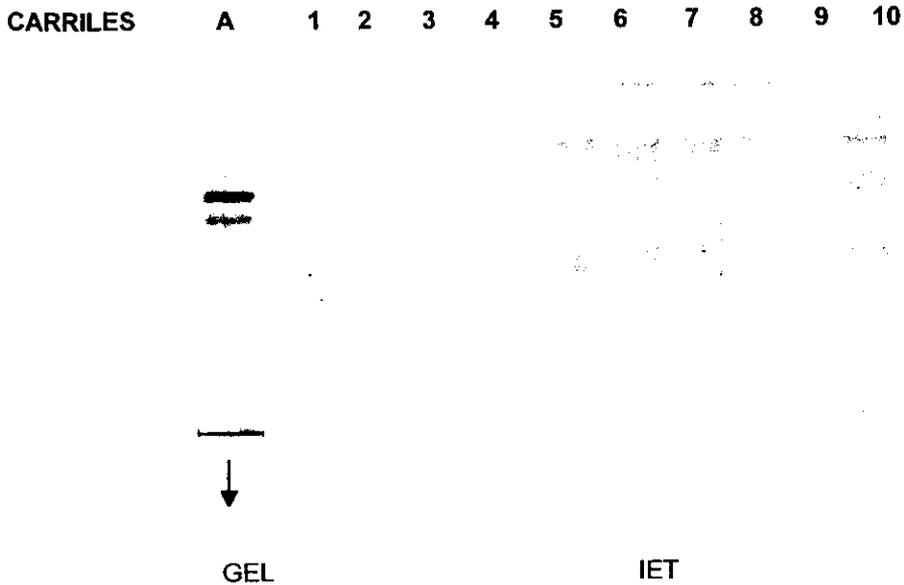
Se compararon los dos métodos de purificación: gradiente de sacarosa y precipitación con polietilenglicol a través de una electroforesis; una vez identificado el mejor método de purificación del virus se prosiguió a probar diferentes cantidades del purificado: 5,10,15,20,25 y 40 μ l, en geles discontinuos de acrilamida del 12 y 4 % respectivamente, con la finalidad de encontrar la cantidad que nos diera mayor resolución de las bandas siendo esta la cantidad de 20 μ l. En la **figura 8**, se presenta la comparación de los dos métodos de purificación para el VHS: gradiente de sacarosa y precipitación con polietilenglicol, encontrándose una mayor resolución e intensidad así como mayor número de bandas en la purificación con sacarosa al 20% (en el carril No. 2) en comparación con la purificación por polietilenglicol (carril No 1) con 20 μ l de muestra cada uno.

Figura 8. Electroforesis de los dos purificados antigénicos por: precipitación con



Para los geles preparativos se utilizaron 200 μ l del purificado viral y en el otro pozo se adicionaron los marcadores de peso molecular Rainbow de un rango de 220-14.3 Kda, dentro del cual entran los pesos moleculares de las glicoproteínas de interés: gB,gC,gD,gG1,gG2,gH,gl,gE,gK. Los geles se corrieron a 110 V hasta que la muestra atravesara el gel concentrador y después a 180 V en un tiempo aproximado de 1h 30 min. Con la subsecuente transferencia pasiva en 72 h. Dentro de los ensayos realizados en las transferencias de las proteínas virales, se tomó como control en la electroforesis el sobrenadante de células sin infectar lisadas por congelación y descongelación; este gel (A) fue transferido y enfrentado a un suero positivo a VHS carriles 1,2,3,4; esto se realizó con la finalidad de verificar que no existiera reconocimiento de los anticuerpos contra el VHS hacia alguna proteína de la línea celular BGM, es decir que no existiera reactividad cruzada entre estas y los antígenos del VHS, lo cual no se encontró por lo que se descarta la posibilidad de bandas no específicas en la Inmunolectrotransferencia realizada. En los carriles 5-10 se muestra el purificado viral con sacarosa al 20%, revelado con sueros de pacientes positivos al VHS. **Figura 9.**

Figura 9. Electroforesis e IET del sobrenadante de células sin infectar.



En el desarrollo de este proyecto se inició con un bloque de 26 tiras de nitrocelulosa con antígeno del VHS-1, los cuales fueron enfrentados con sueros de pacientes positivos para el Virus herpes simple estos fueron diagnosticados previamente por la técnica de ELISA la cual tan solo detecta anticuerpos clase IgM y no diferencia entre infecciones causadas por el VHS tipo 1 y el VHS tipo 2. Inicialmente la IET de éstos 26 sueros positivos, se realizó por duplicado con la finalidad de verificar la reproducibilidad de la prueba. En el **cuadro 4**; se presentan estos resultados, correlacionando el cuadro clínico de 11 pacientes que contaban con historial clínico y el diagnóstico realizado por la técnica de ELISA y la IET.

CUADRO 4: Relación del cuadro clínico del paciente con el diagnóstico para VHS por ELISA y el IET con antígeno VHS-1.

No. de muestra	Edad	Cuadro Clínico	Dx. ELISA	IET VHS-1
4129	24 años	Abortó a las 9 semanas, flujo amarillo-verdoso, contacto con posible escarlatina y varicela.	Positivo	Positivo
4949	26 años	Madre de un paciente con hidrocefalia	Positivo	Positivo
5603	32 años	Madre de un paciente con sepsis neonatal	Positivo	Positivo
6166	43 años	Adenomegalias cervical e inguinal, indoloras	Positivo	Positivo
6295	27 años	Neuroretinitis, trombosis	Positivo	Positivo
6391	R/N	Dificultad respiratoria, enfermedad de membrana hialina.	Positivo	Positivo
6568	R/N	Hiperplasia suprarrenal	Positivo	Positivo
6714	R/N	Asfixia perinatal, microcefalia.	Positivo	Positivo
7566	R/N	Meningoencefalitis, Sepsis, Ictericia multifactorial	Positivo	Positivo
7568	R/N	Abortó previo de la madre	Positivo	Positivo
7574	34 años	2º Producto con síndrome de TORCH	Positivo	Positivo

En el cuadro 4; es importante observar que para los pacientes estudiados, se correlacionan los síntomas producidos por el VHS con los resultados obtenidos en la prueba de ELISA los cuales son confirmados con la IET. Se observa el cuadro clínico característico de las infecciones por VHS; principalmente infecciones de tipo neonatal en las muestras: 6391, 6568, 6714, 7566, 7568. Las cuales ocasionan grandes trastornos en el recién nacido o en el feto poniendo en peligro la vida de la madre y el producto. Así como otros dos casos: 5603,6295, en los cuales la infección invade ciertos órganos debido a que el virus llegó a torrente sanguíneo (viremia), concordando esto con los resultados positivos de ELISA y de la IET.(41)

Posteriormente se estudiaron 44 muestras correspondientes a: Muestras positivas por la técnica de ELISA (14), muestras indeterminadas por la técnica de ELISA (15), y muestras negativas (15).

En un segundo bloque de 45 tiras de nitrocelulosa con antígeno del VHS-1 se enfrentaron a 14 sueros positivos a anticuerpos contra el VHS, 15 sueros indeterminados y 15 sueros negativos por la técnica de ELISA, estos resultados se presentan en el **Cuadro 5**.

CUADRO 5. Relación del cuadro clínico del paciente con el diagnóstico para VHS por ELISA, comparando con los resultados obtenidos por la IET con antígeno del VHS-1.

No. De Muestra	Edad	Dx. ELISA	IET con antígeno del VHS
6488	17 años	Ind	Positivo
6760	R/N	Ind	Positivo
7551	R/N	Ind	Positivo
6897	R/N	Ind	Positivo
7564	2 años	Ind	Positivo
7766	30 años	Ind	Negativo
7245	6 años	Ind	Positivo
7258	R/N	Ind	Positivo
7886	23 años	Ind	Positivo
6937	16 años	Positivo	Positivo
6327	R/N	Positivo	Positivo
5983	16 años	Positivo	Positivo
4316	15 años	Positivo	Positivo
6518	33 años	Positivo	Positivo
7246	44 años	Positivo	Positivo
6858	R/N	Positivo	Positivo
7257	5 años	Positivo	Positivo
7298	20 años	Positivo	Positivo
7818	30 años	Negativo	Positivo
7872	23 años	Negativo	Positivo
7885	R/N	Negativo	Positivo
7825	30 años	Negativo	Positivo
7752	8 meses	Negativo	Indet *
7795	R/N	Negativo	Positivo
7775	R/N	Negativo	Indet *
7787	R/N	Negativo	Positivo
7703	5 meses	Negativo	Negativo
7346	85	Negativo	Positiva
7891	R/N	Negativo	Positiva
7889	32 años	Negativo	Positiva

* Indeterminado; tan solo presenta un par de bandas.

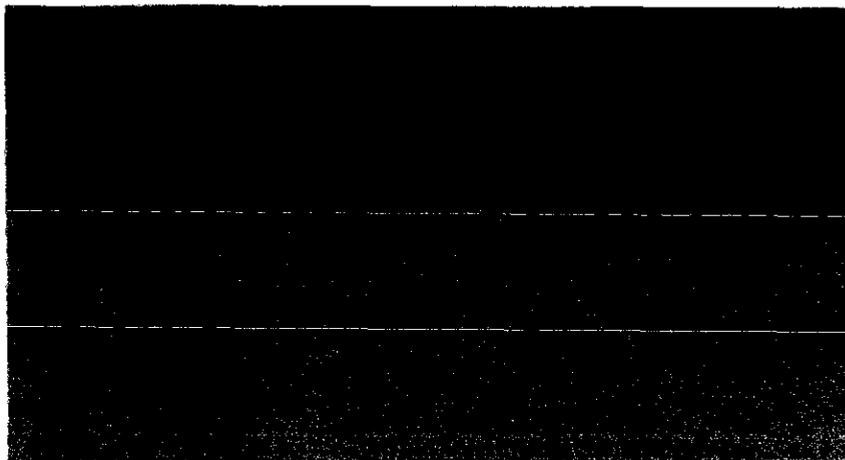
En este cuadro se puede observar que los 8 sueros indeterminados por ELISA, por IET dan positivos, y los 9 sueros positivos por ELISA son también positivos por IET, también se observó que en 2 de los 12 negativos por ELISA por IET son indeterminados asociando estos resultados con la edad del paciente, se puede suponer que debido a la edad del recién nacido (R/N) se puede encontrar en el periodo en que los anticuerpos de la madre ya disminuyeron o desaparecieron y su organismo todavía no tiene la capacidad inmunológica para producir con eficacia el título de anticuerpos necesarios para que estos sean detectados por estas técnicas. Con respecto al paciente de 30 años el cual tanto por ELISA como por IET se obtuvieron resultados negativos, puede ser debido se puede suponer que este paciente puede estar inmunosuprimido o inmunocomprometido por lo cual su producción de anticuerpos es muy baja o nula.

ANÁLISIS DE LAS TIRAS DE LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

El cálculo del peso molecular de las bandas antigénicas reconocidas se realizó por la determinación del Rf (distancia del límite superior del gel a la banda de interés / distancia del límite superior del gel hasta el frente de corrimiento). Extrapolando los RF obtenidos de cada banda en la IET con antígenos del virus herpes simple tipo 1 y antígenos del virus herpes simple tipo 2 con la curva de marcadores de peso molecular **figura 10**; (ambos ensayos revelados con sueros positivos por ELISA para el VHS), para obtener así su peso molecular experimental. Estos resultados se muestran en el **cuadro 6**, en donde se comparan con los PM reportados en la literatura.

PM de las bandas obtenidas experimentalmente (Kda) en la IET con antígenos VHS tipo 2	PM de las bandas obtenidas experimentalmente (Kda) en la IET con antígenos VHS tipo 1	PM de las glicoproteínas reportadas en la literatura (Kda)
-	224	-
196	197	-
-	184	-
172	-	-
148	-	-
-	-	gB 126
133	132	gC 123-131
117	-	gG2 118
-	105	-
77	-	gI 70
-	66	gD 59
54	52	gD 59
-	50	-
48	48	-
44	44	-
-	42	gG1 37-42
41	-	-
40	40	-
36	37	gK 36
34	34	-
-	31	-
28	-	-
25	26	-
23	24	-
21	20	-
19	-	-
18	18	-
15	-	-

Figura 10. Curva de calibración de los marcadores de peso molecular



En las siguientes figuras se muestra las IET con antígeno del VHS-1 revelados con sueros de pacientes positivos al VHS (**fig.11**); IET del VHS-1 revelado con sueros de pacientes positivos a EB (**fig. 12**); IET del VHS-2 revelados con sueros positivos al VHS (**13**) y con sueros de pacientes positivos a CMV, EB (**fig. 14**).

Figura 11. IET del VHS-1 revelados con sueros de pacientes positivos al VHS.

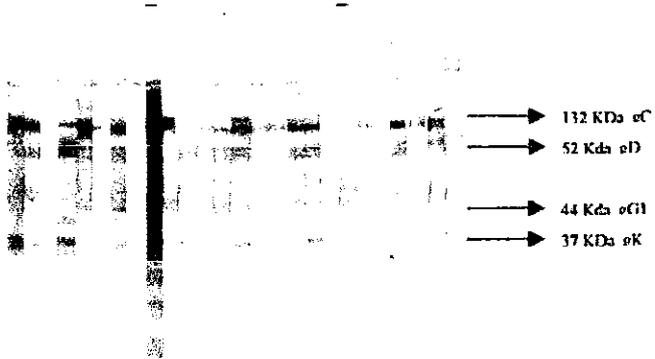


Figura 12. IET del VHS-1 revelado con sueros de pacientes positivos a EB.

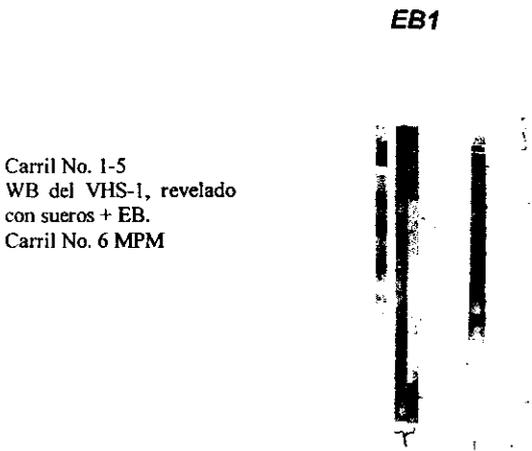


Figura 13: IET del VHS-2, revelado con sueros de pacientes positivos al VHS

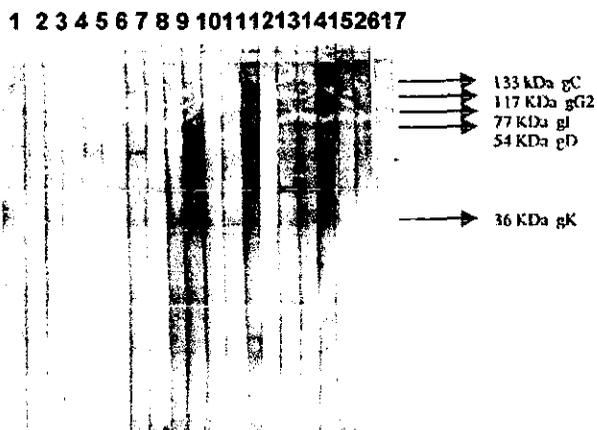
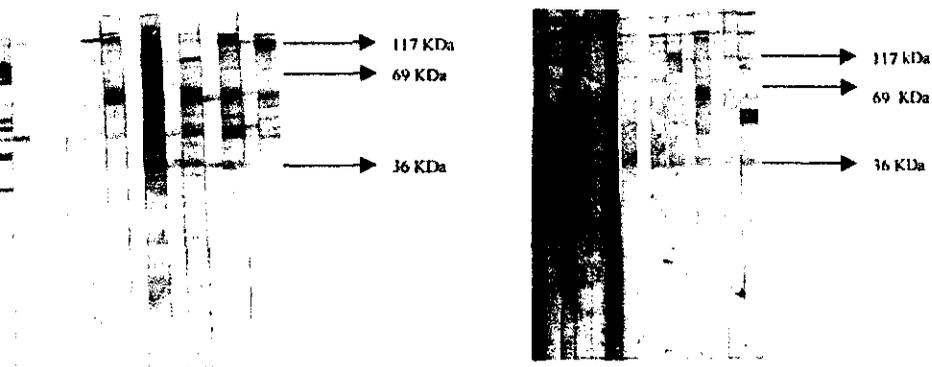


Figura 14: IET del VHS-2, revelado con sueros de pacientes positivos a CMV y EB.



WB del VHS-2
revelado con sueros
+ al CMV

IET del VHS-2
revelado con
sueros de
pacientes + al EB

A la par se probarón sueros positivo para EB y CMV con tiras de la IET para los antígenos del VHS-1 y VHS-2, con la finalidad de identificar si existe reactividad cruzada entre antígenos de otros miembros de la familia Herpesviridae, principalmente con un representante de las otras dos subfamilias de acuerdo a la clasificación de esta familia; Epstein-Barr el cual pertenece a la subfamilia gamaviridae y Citomegalovirus el cual pertenece a la subfamilia betaviridae; se utilizaron 15 tiras de la IET con antígeno tipo 2 para cada uno de los virus mencionados y 2 tiras del IET con antígeno tipo 1 para Epstein-Barr. Figuras 11 y 13. Los pesos moleculares experimentales de las bandas comunes para miembros de la familia Herpesviridae se obtuvieron de la manera descrita anteriormente. Los cuales se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Bandas comunes entre: CMV y EB con VHS.

PM de las bandas obtenidas experimentalmente (KDa) en la IET con antígenos VHS tipo 2, revelado con sueros positivos al virus Epstein Barr.	PM de las bandas obtenidas experimentalmente (KDa) en la IET con antígenos VHS tipo 2, revelado con sueros positivos al Citomegalovirus.
-	-
-	-
-	49.78
69	69
36	36
-	-
117	117

6 DISCUSIÓN.

Las infecciones por el virus del Herpes Simple (VHS) ocurren frecuentemente en todo el mundo, diversos estudios demuestran que en la población el 80% de los individuos son seropositivos al VHS-1 (27,30).

El VHS tiene gran importancia clínica debido a las infecciones oro-labiales y genitales siendo estas las más comunes, pero también produce infecciones: en ojos, sistema nervioso central, neonatales y cutáneas.

En este proyecto el Diagnóstico de los Virus del Herpes Simple Tipos 1 y 2, se realizó por medio de la técnica de Inmunoelctrotransferencia, para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos hacia los antígenos del HSV-1 y 2 respectivamente. También se analizó si existe reactividad cruzada con antígenos del virus Epstein Barr y Citomegalovirus los cuales pertenecen a la misma familia (Herpesviridae).

La importancia de implementar la técnica de IET se debe a que puede ser una herramienta útil para su uso en estudios seroepidemiológicos debido a la existencia de reactividad cruzada entre los antígenos del VHS-1 y VHS-2, por lo cual es muy difícil establecer el tipo de virus infectante por pruebas serológicas de rutina como es el caso de las técnicas: ELISA, Cultivo Celular (CC). Mientras que en la IET, se puede realizar la identificación de los dos subtipos a través de la glicoproteínas gG-2 por lo cual esta técnica es muy útil en el diagnóstico diferencial de los dos subtipos.

En este proyecto se estandarizó y se implementó la IET con antígenos del VHS-1 y 2. Aunque cabe mencionar que con la IET con antígeno del VHS-1, no se logra determinar el subtipo del VHS que esta ocasionando la infección al paciente, ya que el parámetro utilizado para diferenciar entre ambos subtipos, es la aparición de la banda de 118 Da, la cual es producida por el VHS-2. La finalidad de realizar la IET con el VHS-1, fue buscar si existía alguna proteína con el mismo PM que la gG-2 producida por alguna variación en la transcripción y traducción del virus utilizado. (34)

En el caso de la IET con antígeno del VHS-2 se logró identificar una proteína con un PM de 117 KDa, la cual se identificó como la gG-2, lo que concuerda con lo reportado en la literatura por medio de la cual se realizó la tipificación de virus causante de la infección, siendo para todos los casos el subtipo- 2 lo cual correlaciona con el cuadro

clínico de los pacientes, que en la mayoría de los casos fueron enviados al laboratorio por sospecha del síndrome de TORCH en los recién nacidos y abortos previos con sospecha de infección genital ocasionada por VHS en los pacientes adultos, denotando así que en infecciones genitales el subtipo con mayor prevalencia es el VHS-2. La intensidad de esta banda fue muy débil lo cual dificultó la interpretación de los resultados en la inmunodetección. Sin embargo se sabe que el gene de la gG no es esencial para la infectividad del virus por lo cual es posible que en algunas cepas no se expresen las gG, aunque esto ocurre en muy baja frecuencia. Por otro lado se evaluó la reactividad cruzada con otros miembros de la familia Herpesviridae: CMV y EB, usando sueros positivos a estos virus los cuales fueron enfrentados con tiras con antígeno del VHS-1 y 2. Observándose que hubo reconocimiento de los anticuerpos del suero con las bandas que se asumen son las glicoproteínas gK, gI y una proteína que tiene un PM cercano a la gG-2 para ambos virus, esto podría indicar que existe una alta reactividad cruzada entre los antígenos de esta familia, lo cual no se puede afirmar ya que es posible que estos pacientes presentarán una infección subclínica o clínica causada por el VHS, por lo cual también presentaban anticuerpos contra el Virus Herpes Simple (tipo 1 y/o 2), por lo que se asume que más que cruce antigénico es un reconocimiento específico de antígeno-anticuerpo. En la literatura se reporta que el virus de Epstein Barr expresa una glicoproteína de 110 KDa, la cual consideran homóloga a la gB de los 2 tipos de herpes simple, la cual participa también en la fusión del virus con la célula, sin embargo, no se presentó esta glicoproteína en las IET del VHS-1 y VHS-2. Con base a los resultados obtenidos se demostró que la IET para el VHS nos permite diferenciar entre el VHS-1 y el VHS-2, en condiciones en las cuales normalmente el tipo viral infectante se desconoce, sin embargo, es necesario optimizar la purificación de la gG-2 específicamente, o bien contar con un sistema que nos permita obtener esta glicoproteína en mayores concentraciones, como sería su clonación y producción, a través del uso de diferentes vectores de expresión (por ejemplo baculovirus), contando así con una herramienta útil en estudios epidemiológicos. **(8,34, 39.)**

7 CONCLUSIONES

3.1 Se llevó a cabo la estandarización de la técnica de IET para los antígenos del VHS-1 y VHS-2.

3.1.1.1 Se logró establecer la cinética de infección encontrando que el tiempo donde se observa el mayor efecto citopático es 44 hrs post-infección.

3.1.1.2 Se encontró que el mejor método de purificación para los VHS-1 y 2 fue el de gradiente de sacarosa en el cual se observan un mayor número de antígenos vírales, así como una mayor definición de las bandas.

3.1.1.3 Se detectó que sí existe reconocimiento hacia los antígenos del VHS-1 y 2, en sueros positivos CMV y EB, lo cual nosotros asumimos como un reconocimiento específico, debido a la presencia de anticuerpos contra antígenos del VHS en los sueros probados. Por lo cual no existe una alta reactividad cruzada entre miembros de la familia herpesviridae.

3.1.1.4 A través de la técnica de IET se logró diferenciar entre el serotipo 1 y el serotipo 2 del VHS, además de que no se encontró que haya algún reconocimiento hacia las proteínas de las células BGM por los anticuerpos dirigidos para el VHS.

8 APÉNDICE

1.-BIS-ARILAMIDA.

Acrilamida.....	30.0 g
Bis-Acrilamida.....	0.8 g
Agua destilada y desionizada.....	100 ml

*Filtrar y almacenar protegido de la luz a 4 ° C. Máximo almacenamiento 30 días.

*Usar guantes y cubrebocas al pesar la acrílamida.

2.-TRIS- BASE 1.5 M; pH 8.8

Tris-base.....	18.16 g
Agua destilada.....	100 ml

*Ajustar el pH usando HCl 1 N.

3.-TRIS-BASE 0.5 M; pH 6.8

Tris-base.....	6.05 g
Agua Destilada.....	100 ml

*Ajustar el pH usando HCl 1 N.

4.-SDS 10%

SDS.....	10 g
Agua desionizada.....	100 ml

- *Agitar suavemente para disolver.
- *Almacenar a temperatura ambiente.

5.- PERSULFATO DE AMONIO 10%

Persulfato de amonio.....	100 mg
Agua destilada.....	1 ml

- *Preparar al momento de usarse.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA 2X.

Tris-base 0.5 M ; pH 6.8	3.2 ml
SDS al 10%.....	4.0 ml
Glicerol.....	2.0 ml
DTT.....	0.308 g
Azul de bromofenol.....	0.01 g
Agua Destilada c.b.p.....	20 ml

AMORTIGUADOR DE LISIS.

Tris-Base 0.05 M, pH 7.2.....	60.50 g
NaCl.....	87.66 g
SDS 10 %.....	0.1 %
Tritón X-100.....	1.0 %
Deoxicolato	1.0 %
*PMSF.....	1 M

- *Prepare un solución madre 1 M de PMSF: Disuelva en 0.871 g en 50 ml de DMSO.
- Y adicione 100 µl PMSF / 10 ml de amortiguador de lisis.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA 5X.

Tris-base.....	15 g
Glicina.....	72 g
SDS al 10%.....	5.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

*Ajustar el pH a 8.3.

*Para usarse diluir 1X; ajustar el pH.

GEL RESOLUTOR 12%

Bis-acrilamida.....	8.0 ml
Tris-base 1.5 M; pH 8.8.....	5.0 ml
SDS 10%.....	200 μ l
Agua destilada.....	6.7 ml

*Desgasificar 15 min. a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio 10 %.....	100 μ l
TEMED.....	10 μ l

GEL CONCENTRADOR 4 %.

Bis-acrilamida.....	1.3 ml
Tris-base 0.5 M; pH 6.8.....	2.5 ml
SDS al 10 %.....	100 μ l
Agua destilada.....	6.1 ml

*Desgasificar 15 min a temperatura ambiente.

Persulfato de amonio.....	50 μ l
TEMED.....	10 μ l

**Desgasificar 15 min. A temperatura ambiente.*

Persulfato de amonio 10%.....	200µl
TEMED.....	14 µl

SOLUCIONES PARA LA TRANSFERENCIA.

Amortiguador de transferencia 10X.

NaCl.....	29.22 g
EDTA.....	6.724 g
Tris-base.....	12.11 g
Agua bidestilada c.b.p.....	1 L

**Ajustar el pH a 7.0; para usarse diluir a 1X.*

Soluciones para la Inmunolectrotransferencia

-

PBS 10X

Solucion A

Na ₂ HPO ₄	14.2 g
Na Cl	87.6 g
Agua bidestilada c.b.p.....	1 L

Solución B

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O.....	6.9 g
NaCl.....	43.8 g

**Agregar B a A hasta ajustar el pH de 7.4*

Solución de bloqueo (PBS- Albúmina bovina al 3%)

Albúmina bovina 15 g
PBS pH 7.4 c.b.p..... 500 ml

Solución de lavado (PBS-Tween 20 al 2%)

Tween 20..... 2 ml
PBS pH 7.4 c.b.p..... 1000ml

Solución de dilución (PBS-Tween 20 al 2%-Albúmina bovina 1%)

Tween 20 2ml
Albúmina bovina 10 g
PBS pH 7.4 c.b.p..... 1000ml

Reactivo de revelado.

DAB* 0.015 g
PBS pH 7.4..... 30 ml
Peróxido de hidrógeno al 30%..... 30 μ l

* DAB (3',3' diaminobencidina)

8 BIBLIOGRAFIA.

1. Ashley, R.L., Wu, Lu., Pickering, J.W., Tu, M.C. & Schnorenberg, L. 1998. Premarket evaluation of a commercial glycoprotein G-based enzyme immunoassay for herpes simplex virus type –specific antibodies. *J.Clin.Microbiol.* 36: 294-5.
2. Arvin, A.M., Koropchak, C.M., Yeager, A.S. & Pereira, L.P. 1983. Detection of type-specific antibody to Herpes Simplex Virus type-1 by radioimmunoassay with Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C purified with monoclonal antibody. *Infection and immunity.* 40: 184-189.
3. Baker, D.A. & Gonik, B. 1998 Clinical evaluation of a new Herpes Simplex Virus ELISA: a rapid test for HSV. *The American College of Obstetricians and Gynecologists.* 73; 322-325.
4. Buckmaster, E.A., Gompels, U. & Minson, A. 1984. Characterisation and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115×10^3 molecular weight. *Virology* 139: 408- 413.
5. Cattani, P. & Rossolini, G.M. 1997. Detection and Typing of HSV by using Recombinant Immunoglobulin Fragments produced in Bacteria. *J. Of microbiology.* 1504-09.
6. Corey L. & Spear P. 1986. Infections with Herpes Simplex Viruses. *J. of Med.* 314-326.
7. Doller, E., Aucker, J. & Weissbach, A. 1979. Persistence of herpes simplex virus type 1 in rat neurotumor cells. *J. of Virol.* 29: 43-50.
8. Fields, B.N. & Knipe, D.M. 1990. *Virology* Vol. 2. Ed. Raven Press. Segunda Ed. 1787-1887.

9. Galvan, V. & Roizman, B. 1998. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. 31;3931-6.
10. Gerber, S.I., Belval, B.J. & Herold, B.C. 1995. Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. 214: 29-39.
11. Heilman, C., Zweig, M., Stephenson, J.R. & Hampar, B. 1979. Isolation of a nucleocapsid polypeptide of herpes simplex virus type 1 and 2 possessing immunologically type-specific and cross-reactive determinants. *J. of Virol.* 29: 34-42.
12. Jerome, K.R., Tait, J.F., Koelle, D.M. & Corey, L. 1998. Herpes simplex virus type 1 renders infected cells resistant to cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J. Virol.* 72 :436-41.
13. Johnson, D.C. & Feenstra, V. 1987. Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J. of Virology.* 2208-2216.
14. Klupp, B.G, Baumeister, J., Dietz, P., Granzow, H. & Mettenleiter, T.C. 1998. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J. Virol.* 72: 1949-58.
15. Laquerre, S., Anderson, D.B., Argnani, R. & Glorioso, J.C. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein B requires a cysteine residues at position 633 for folding, processing, and incorporation into mature infectious virus particles. *J. Virol.* 72: 4940-4949.

16. Laquerre, S., Argnani, R., Anderson, D.B., Zucchini, S., Manservigi & Glorioso, J.C. 1998. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to cell spread. *J. Virol.* 72:6119-6130.
17. Lubinski, J., Nagashunmugam, T. & Friedman, H.M. 1998. Viral interference with antibody and complement. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9; 329-37.
18. Lubinski, J., Wang, L., Soulika, A.M., Burger, R., Wetsel, R.A., Colten, H., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Lambris, J.D. & Friedman, H.M. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *J. of Virol.* 72: 8257-63.
19. Marjorie, J.M. 1997. Viral taxonomy. *Clinical Infec. Dis.* 25: 18-20.
20. Mikloska, Z. & Cunningham, A.L. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC, y gD are major targets for CD4 T- lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* 79; 353-61.
21. Mir, A.A. 1995. The 140- Kda RR1 protein from both HSV-1 and HSV-2 contains an intrinsic protein Kinase activity capable of autophosphorylation but it is transphosphorylation defective. *Virology.* 207: 409-416.
22. Murray, P. R. & Baron E. J. 1990. Herpes Simplex Virus. *Manual of Clinical Microbiology.* Sixt. Ed. 876-882.
23. Nagashunmugam, T., Lubinski, J., Wang, L., Goldstein, L.T., Weeks, B.S., Sundaresan, P., Kang, E.H. & Dubin, G. 1998. In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J. of Virol.* 72: 5351-59.

24. Nass, P.H., Elkins, K.L. & Weir, J.P. 1998. Antibody response and protective capacity of plasmid vaccines expressing three different herpes simplex virus glycoproteins. *J. Infect. Dis.* 178; 611-617.
25. Nicola, A.V., Ponce De Leon, M., Xu, R., Hou, W. Whitbeck, J.C., Krummenacher, C., Montgomery, R.I., Spear, P.C., Eisenberg, R.J. & Cohen, G.H. 1998. Monoclonal antibodies to distinct sites on herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D block HSV binding to HVEM. *J. Virol.* 72: 3595-3601.
26. Peng, T., Ponce de Leon, M., Jiang, H., Dubin, G., Lubinski, J.M. & Cohen, G.H. 1998. The gH-gL complex of herpes simplex virus (HSV) stimulates neutralizing antibody and protects mice against HSV type 1 challenge. *J. Virol.* 72: 65-72.
27. Plummer, G. 1973. A review of the identification and titration of antibodies to herpes simplex viruses type 1 and type 2 in human sera. *Cancer research.* 33: 1469-1476.
28. Plummer, G., Waner, J.L., Phuaangsab, A., & Goodheart, C.R. 1970. Type 1 and type 2 herpes simplex viruses: serological and biological differences. *J. Virology.* 5: 51-59.
29. Regueiro, J.R. & López, C. 1998. *Inmunología. Biología y Patología del sistema inmune.* Segunda edición. 174.
30. Riley, L.E. 1998. Herpes simplex virus. *Semin. Perinatol.* 22:284-92.
31. Roizman, B. & Fawcett, R.L. 1994. The molecular basis of herpes simplex virus. *Virology.* 5: 261-271.
32. Roizman, B. & Furlong, D. 1974. The replication of herpesviruses. *Comprehensive virology.* 3: 229-403.

33. Roller, R.J. & Rauch, D. 1998. Herpesvirus entry mediator HVEM mediates cell-cell spread in BHK(TK-) cell clones. *J. of Virol.* 72: 1411-1417.
34. Rosenthal, S.L & Lawrence, R.S. 1997. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 and CMV in adolescents. *Clinical Infectious Diseases.* 24: 135-139.
35. Sánchez, D.M., Scott, D.S., Whittington, W., Brown, D., Reeves, W.C. & Whitley, R.J. 1991. Evaluation of a test based on baculovirus – expressed glycoprotein G for detection of herpes simplex virus type – specific antibodies. *The Journal of Infectious Diseases.* 164: 1196-9.
36. Schmidt, Nathalie J.PhD. & Emmons, R.W. MD, PhD. 1989. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. 6th Edition. 265-317.
37. Stomka, M.J., Emery, L., Munday, P:E., Mousdale, M. & Brown, D.W. 1998. A comparison of PCR with virus isolation and direct antigen detection for diagnosis and typing of genital herpes. *J.Med.Virol.* 55: 177-83.
38. Spear PG. 1984. Glycoproteins specified by herpes virus. Roizman B, Ed *The Herpesviruses.* Vol 3. Plenum Press. 315.
39. Stevens, Jack G. 1989. Human Herpes Viruses: a consideration the latent state. *Microbiological Reviews.* 318-332.97. 1504-1509.
40. Vestergaard, F. B. 1980. Herpes Simplex Virus Antigens and Antibodies: A survey of studies. *Review of infectious diseases.* Vol. 2, No. 6.
41. Weizhong Cal, Baohua Gu, & Stanley Person. 1988. Role of Glycoprotein B of Herpes Simplex virus Type 1 in viral Entry and Cell fusion. *J. Of Virology.* 2596-2604.