

17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"CONFIRMACION DE CITOMEGALOVIRUS Y HERPES
SIMPLE-II POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N :

MARIA ELENA FLORES PONCE
MIRIAM HINOJOSA MORALES

DIRECTOR: Q.F.B. SARA R. JUAREZ ENRIQUEZ
ASESORA: Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

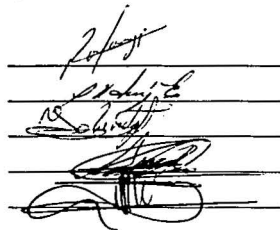
FLORES PONCE MARIA ELENA

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

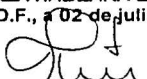
Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Confirmación de citomegalovirus y herpes simple-II por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL* Q.F.B. SARA R. JUÁREZ ENRIQUEZ
SECRETARIO. Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA
SUPLENTE Q.F.B. JESÚS ARROYO ROSALES
SUPLENTE Q.F.B. MA. LOURDES VEGA NAVARRETE



ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., 02 de julio de 2002.


Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

HINOJOSA MORALES MIRIAM

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Confirmación de citomegalovirus y herpes simple-II por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL* Q.F.B. SARA R. JUÁREZ ENRIQUEZ
SECRETARIO Q.F.B. YOLANDA FLORES CABRERA
SUPLENTE Q.F.B. JESÚS ARROYO ROSALES
SUPLENTE Q.F.B. MA. LOURDES VEGA NAVARRETE

A T E N T A M E N T E.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 02 de Julio de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
JEFETE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

Por su paciencia, apoyo y tiempo que nos brindó en la realización de este trabajo, como el habernos permitido conocer su calidad humana y profesional.

Por ser una persona maravillosa y sencilla.

Dr. Rubén Marroquín Segura

Por ser el gran profesor y ser humano que con sus enseñanzas y consejos, nos mostró su apoyo incondicional y el camino para seguir adelante.

Q.F.B. Sara R Juárez Enriquez

Por sus atenciones, apoyo y aceptación de nuestra estancia en el laboratorio para la realización este trabajo.

Q.F.B. Ma. Lourdes Vega Navarrete

Por su disponibilidad, enseñanzas durante la carrera y el tiempo que nos otorgó para las correcciones de este trabajo y por ser como es.

Q.F.B. Jesús Arroyo Rosales

Por sus consejos y tiempo para la revisión este trabajo.

Y a todos nuestros profesores de la carrera de Q.F.B. de la FES-Zaragoza.

Por mi raza hablará mi espíritu.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Felicitas

Por su tiempo, apoyo incondicional y sobre todo por su valiosa amistad que nos brinda en todo momento.

Gracias por compartir de los momentos importantes de nuestras vidas.

Maria Magdalena

Por ser una tierna y dulce mujer que te caracteriza, que siempre hay una muestra de cariño y afecto que nos motiva a seguir adelante.

Gracias por tu amistad.

Adrián García (Pedro) y Luis Martínez

Por su apoyo y sus valiosos consejos en la realización este trabajo.

Los Químicos de Laboratorio de rutina y Pruebas especiales

Oscar, Silvia Cano, Silvia Cortes, Joaquina, Juan Pablo...,etc.

Por su amistad y por habernos permitido convivir con ustedes durante nuestra estancia en el laboratorio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Maria Elena

DEDICADA A

Mi mamá Gabina Ponce Lora

Por ser más maravilloso del mundo, gracias por el apoyo moral, su cariño y comprensión que desde siempre me ha brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

Gracias por guiar mi vida con energía esto lo que ha hecho que sea lo que soy.

En memoria de mi papá Santiago Flores Sánchez

Por que ha sido para mí un hombre grande y maravilloso, que siempre admire.

Mis hermanos

Enrique Flores Ponce, José Alfredo Flores Ponce, Yolanda Flores Ponce, Arturo Flores Ponce, María Rosario Flores Ponce, María Cecilia Flores Ponce, Moisés Flores Ponce, Alma Leticia Flores Ponce, por estar siempre conmigo y su apoyo que en todo momento me brindaron.

Mis sobrinos

Ernesto Iván Martínez Flores, Carolina Martínez Flores, por su comprensión y cariño que siempre me han mostrado.

Mi novio

Víctor Manuel por estar en todo momento conmigo y su tenacidad de alentarme de seguir adelante, gracias por ser como eres.

Los Químicos

Leticia Barrera, Guadalupe, Dora...etc., del Laboratorio Central del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por su amistad incondicional y haberme permitido convivir con ellos.

Mis amigos de la FES

Maria Laura Ventura Ayala, Miriam Hinojosa Morales, Lilia Tequianes Bravo, Luz María González, Martha Grifaldo Padrón, Guadalupe Rincón, Miriam Soriano, Carolina Hernández, Doris Edith Montesinos, Leticia Bazán, Araceli Galán Jiménez, Rubén Miranda, por la gran amistad que se dio a través de la carrera.

Y sobre todo a Dios por permitirme vivir y disfrutar estos momentos como persona y profesional

Miriam

DEDICADA A

Dios, por la fortuna de existir, de los momentos agradables y difíciles que tuve que caminar para lograr esta meta, por enseñarme que se debe aprovechar cada uno de los instantes de la vida, no importando el lugar, ni la gente con que te encuentres, sino valorar lo que tienes.

Mi papá Juan Hinojosa Abasolo

Por todo su apoyo, consejos que me ayudaron en mi formación como hija y estudiante, así como su ayuda para el logro de este trabajo.

Mi mamá Regina Morales Jiménez

Por ser una mujer y madre ejemplar de espíritu incansable, que sabe transmitir amor y perseverancia aún en los momentos más difíciles, cuando a mis hermanos o a mí necesitamos de esa energía para hacer posible nuestros sueños.

Gracias por ser como eres, por existir y por estar a mi lado.

Mis hermanos Carlos y Joana Yazmin

Por ser ante todo mis amigos, el apoyo incondicional que me han dado y por caminar junto conmigo en la realización de este trabajo, que sin su ayuda no hubiera podido lograrlo.

Mis tíos

Por su apoyo, consejos y ayuda para seguir adelante, principalmente a Paula y Ángel Hinojosa por sus motivaciones, disposición para mejorar en lo profesional, como en los problemas de salud y sobre todo por estar a mi lado paso a paso de mi vida.

Somos muchos los que perdemos la mitad de la vida en
desear cosas que podríamos alcanzar, si no perdiéramos la
mitad del tiempo en desearlas.

Wodleot

Mis primos

Por su cariño y entusiasmo de todos, por que esta meta se pudiera lograr, en especial a Simón y Miguel Ángel, por ser dos personitas que me han dado alegrías y momentos inolvidables, que han cambiado mi vida.
A Michael por sus consejos y ayuda en el logro de este trabajo.

Mi abuelo Constancio Morales

Mi hermano Juan Carlos

Mi amiga Luz María

A tres personas inolvidables que ya no están conmigo físicamente, sé que estarían felices por este momento en que algún día ellos hubieran querido lograr.

Mis compañeros y amigos

María Elena Flores, Lilia Tequianes, Luz María González, Martha Grifaldo, Miriam Soriano, Guadalupe Rincón, Marycarmen Cardenas, Arturo Rodríguez, Leticia Bazan, Doris E Montesinos, Rubén Miranda, Rosario Kuyoc, Manuel, Carolina, Jaime, Lourdes Javey por su amistad, apoyo y los hermosos momentos que pasamos dentro y fuera de la facultad.

Hay muchas personas no incluidas por falta de espacio, pero no de mi corazón, a todas ellas que contribuyeron con un granito de arena GRACIAS.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de virología del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (I.S.S.S.T.E.), bajo la dirección de la Q.F.B. Sara R. Juárez Enriquez y la Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
1. Antecedentes históricos	4
2. Historia de Citomegalovirus	6
3. Historia de Herpes Simple	7
4. Citomegalovirus	8
4.1. Características	8
4.2. Datos clínicos	10
4.3. Inmunidad	13
4.4. Epidemiología	14
4.5. Tratamiento, prevención y control	16
5. HERPES SIMPLE	18
5.1. Características	18
5.2. Datos clínicos	22
5.3. Patogenia	25
5.4. Inmunidad	26
5.5. Epidemiología	27
5.6. Tratamiento, prevención y control	28
6. Diagnóstico	30
6.1. Citología/Histología	30
6.2. Microscopia electrónica	31
6.3. Aislamiento y cultivo de virus	31
6.4. Serología	32
6.5. Detección de material genético	34

6.6.Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	36
6.7.PCR de Virus herpes simple	37
6.8.PCR de Citomegalovirus	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
OBJETIVO	40
HIPÓTESIS	40
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	41
DISEÑO ESTADÍSTICO	42
DISEÑO EXPERIMENTAL	43
Material	43
Equipo	43
Reactivos	44
1.Extracción de ADN	44
2.Amplificación	44
3.Visualización	44
Material biológico	44
DIAGRAMA DE FLUJO	45
MÉTODOS	46
1.Conservación de la muestra	46
2.Extracción de ADN	46
3.Amplificación	47
4.Visualización	48
Interpretación de los resultados	51
Detección en placa del producto amplificado	52
RESULTADOS	55
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
CONCLUSIONES	67
PROPUESTAS	68
REFERENCIAS	69

ABREVIATURAS

Ara A:	Arabinósido de adenina
Ara C:	Arabinósido de citosina
ACV:	Aciclovir
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
C :	Citosina
CMV:	Citomegalovirus
CsCl :	Cloruro de cesio
ECP :	Efecto histopatológico
EIC :	Enfermedad por inclusión citoméglica
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático
G :	Guanina
IgA :	Inmunoglobulina A
IgG :	Inmunoglobulina G
IgM:	Inmunoglobulina M
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
µL :	Microlitros
nm :	Nanómetros
PCR :	Reacción en cadena de la Polimerasa
RNA:	Ácido ribonucleico
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC:	Sistema nervioso central
VHS-I :	Virus del herpes simple tipo I
VHS-II:	Virus del herpes simple tipo II
VIH :	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La valoración de infecciones virales por Citomegalovirus (CMV) y virus del Herpes Simple tipo II (VHS-II), es realizada comúnmente por el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), detectando anticuerpos IgG e IgM. En la población abierta, la mayoría de estas personas analizadas por este método son seropositivas a diferentes títulos, a uno, o ambos anticuerpos sin que exista una correlación real con la fase activa de la infección viral.

En México son pocos los hospitales que cuentan con métodos confirmatorios para diagnosticar una infección oportunamente, además de no contar con un control epidemiológico. El presente trabajo tuvo como objetivo, comprobar la presencia de Citomegalovirus y del virus de Herpes Simple tipo II en sueros y plasmas de pacientes enviados al laboratorio de virología del hospital Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, que tenían anticuerpos positivos para IgG e IgM por el método de ELISA; utilizando como método confirmatorio la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el mismo tipo de muestras, el cual es un método donde se logra la detección rápida y específica de fragmentos genómicos, donde se analizaron 125 muestras para cada virus, obteniéndose el 11% de muestras positivas para Citomegalovirus y 0% para Herpes Simple tipo II, por PCR.

La importancia de PCR en el laboratorio clínico de especialidad, como apoyo para el médico es evitar el rechazo del órgano trasplantado, acortar los días de hospitalización, disminuyendo costos en la atención del paciente con una infección viral activa, y en ocasiones evitar su muerte permitiendo así la optimización de los recursos terapéuticos, el manejo adecuado y oportuno de pacientes.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el diagnóstico etiológico de enfermedades virales en pacientes inmunocomprometidos, inmunosuprimidos son en gran parte presuntivos, utilizando la historia clínica del paciente, manifestaciones clínicas y/o pruebas de tamizaje para la detección de anticuerpos. Sin embargo son varios los agentes implicados en la aparición de enfermedades, ejemplo *Herpesvirus*, que son un grupo que pertenece a la familia Herpesviridae y comprende virus grandes, envueltos, con doble cadena, se encuentra tanto en animales como en el hombre.

Su importancia médica radica, en que son los agentes infecciosos más pequeños adquiridos por el hombre, siendo una de sus características principales de estos virus, el causar infecciones persistentes, latentes o con transformación celular.

Entre los miembros importantes de este grupo se encuentran: Citomegalovirus (CMV) y el virus de Herpes Simple tipo I y II, que causan enfermedades como:

Mononucleosis, hepatitis con fiebre, neumonía intersticial en pacientes inmunocomprometidos, malformaciones congénitas y rechazo de órganos de pacientes trasplantados, etc; por Citomegalovirus y Herpes Simple I y II causan gingivoestomatitis (infección orolabial), infección genital, queratitis, encefalitis y probable rechazo de órganos en pacientes trasplantados, etc.

La mononucleosis y el herpes genital son las presentaciones más usuales en el humano, sin embargo las infecciones de mayor relevancia clínica, son las neonatales, malformaciones congénitas y las infecciones en pacientes trasplantados, provocando rechazo de órgano. Su fuente de transmisión de estos virus es por secreciones de boca, piel o genitales, transfusiones sanguíneas y órganos trasplantados contaminados con el virus.

El Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), es el más utilizado en hospitales, para valorar la respuesta inmunológica en pacientes con infecciones virales, detectando la presencia de anticuerpos de tipo IgG e IgM, sin embargo no es recomendable utilizarla como un diagnóstico de una infección activa. Por lo tanto en la búsqueda de un método confirmatorio, se ha investigado la posibilidad de implementar el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permitiendo así que el médico cuente con información para un mejor manejo terapéutico y tratamiento del paciente.

MARCO TEÓRICO

Los virus pueden causar enfermedades, en particular por la preferencia de un órgano (tropismo). El grupo herpesvirus de la familia *Herpesviridae* constituye un grupo diverso de virus de ADN grande, en el genoma viral hay 2 piezas unidas en forma covalente una larga (L) que comprende 82% de ADN; y otra corta (S) que comprende 18% de ADN. Cada segmento está constituido de secuencias únicas de bases con repetición terminal e interna de las secuencias normales. Las cuatro orientaciones posibles de las secciones L y S, en relación una con la otra, se encuentra en las poblaciones de virus en cantidades iguales; que comparten una morfología común, están ampliamente diseminados y sus infecciones son comunes. Aunque suelen causar enfermedad benigna, pueden provocar morbilidad y mortalidad significativas, sobre todo un individuo inmunocomprometido, en particular los que presentan una alteración de la inmunidad celular, tienen episodios de enfermedad más frecuentes y graves. De forma característica, todos estos agentes producen una infección inicial manifiesta, seguida de un período de infección latente, en el cual el genoma del virus está presente en la célula, pero no el virus infectivo. Los principales miembros del grupo que infectan al hombre son los dos virus del herpes simple tipo I y II (VHS- I y VHS-II), Citomegalovirus (CMV), virus varicela- zoster (VVZ), virus de Epstein-Barr (EBV) y recientemente descubierto herpesvirus humano tipo 6.³ Se habla especialmente de Citomegalovirus (CMV) y herpes simples tipo I y II por la importancia médica.

Se clasifican en tres subfamilias de acuerdo con el tipo de huéspedes infectados por el virus y otras propiedades biológicas. El herpesvirus - α se desarrolla rápidamente en una amplia gama de tejidos y destruye eficazmente las células huéspedes. El herpesvirus- β se desarrolla con lentitud y solamente en ciertos tipos de células. Prácticamente todos los miembros de los herpesvirus- γ se desarrollan con lentitud y solamente en las células linfáticas de sus huéspedes naturales.⁴

Los estudios epidemiológicos demuestran que todos los virus de la familia *Herpesviridae* mencionan que, una sustancial proporción de adultos presentará anticuerpos, reflejo de una primoinfección en una etapa previa de su vida y manifestación de la infección latente. Esto

condicionará el diagnóstico serológico y la interpretación de los resultados de otras pruebas diagnósticas de laboratorio. En los últimos años se ha producido una serie de circunstancias que aconsejan la recopilación y análisis crítico de las técnicas diagnósticas, el impacto que las nuevas tecnologías han tenido sobre las pruebas de laboratorio, o que se prevé tendrán en un futuro próximo. Es el caso de la disponibilidad de anticuerpos monoclonales que simplifican y generalizan el diagnóstico o ayudan en la interpretación de resultados. También, claro está, las técnicas de biología molecular, y muy particularmente la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de la hibridación con sonda específica radiactiva o biotinada.¹⁰

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La palabra virus es de origen latino, solía usarse para designar un veneno o un agente nocivo. Antes del descubrimiento de los virus filtrables, la palabra virus se utilizaba con frecuencia para designar cualquier microbio infectante, sin importar de qué naturaleza. Ciertas enfermedades infecciosas, de las cuales se supo más tarde eran producidas por virus, se conocían mucho tiempo antes de que nadie comprendiese la naturaleza de sus factores etiológicos. No se encontraban bacterias en los cultivos realizados con muestras procedentes de las lesiones de ciertas enfermedades, que sin embargo podían transmitirse de un animal a otro y constituían, pues enfermedades infecciosas indudables. Además, dicho material conservaba su poder infectante después de atravesar los filtros para bacterias. Con el tiempo, este tipo de agentes recibió el nombre de virus filtrables, que más tarde se transformó simplemente en virus.

Una definición reciente del término virus describe como agentes infecciosos pequeños (20 a 300 nm de diámetro) cuyo genoma es un ácido nucleico, DNA o RNA, que se reproduce dentro de las células de organismos vivos y que depende de la maquinaria bioquímica de la célula huésped para su replicación.

Los científicos descubrieron como evitar ciertas enfermedades virales mucho antes que alguien supiera de la existencia de los virus, de los patógenos importantes tenemos a Citomegalovirus (CMV) y Herpes simples II (HSV -II).³

El Citomegalovirus (CMV) es el agente, más difundido que infecta a distintos animales, incluyendo los seres humanos. Es un virus muy antiguo, del cual muchos investigadores se dedicaron a la realización de experimentos por varios años, para confirmar la presencia del agente patógeno, nombrando de diferentes formas a esta enfermedad.

Hay evidencias de que la infección fue descrita desde el año 1879 por Pfeiffer, el cual observó un conjunto de síntomas con cambios hematológicos acompañados con diarrea y en ocasiones alteraciones respiratorias, en un adulto denominándole a este cuadro como "fiebre glandular", actualmente se conoce como mononucleosis infecciosa. Que años

recientes se identificó como una forma adquirida en niños, sintomática o asintomática, asociada con alteraciones de la función hepática que persisten durante varias semanas. Y se ha comenzado a hablar del Citomegalovirus como un agente de infecciones oportunistas en huéspedes inmunocomprometidos, por transmisión o reactivación viral.^{2, 8}

HISTORIA DE CITOMEGALOVIRUS

AÑO	INVESTIGADOR	DESCUBRIMIENTO
1881	Ribbert	Observó grandes células con inclusiones virales en riñones de un muerto con sífilis. Describiendo la inclusión como un cuerpo homogéneo intracelular. ⁸
1907	Ribbert	Identificó inclusiones en 4 de 30 glándulas parótidas obtenidas de niños de 2 meses a 2 años de edad. ⁸
1921	Goodpasture y Talbot	Observaron alteraciones celulares que eran similares a las lesiones cutáneas de la varicela, y que podía deberse a un efecto indirecto de un agente similar sobre la célula. ⁸
1921	Goodpasture y Talbot	Confirmaron la etiología viral de la enfermedad con experimentos realizados en cobayos y demostraron que el virus era sensible al calor y un poco inestable. ⁸
1921 a 1950	Patólogos	Observaron células con inclusión (CI) en glándulas salivales y en otras vísceras, incluyendo pulmón, hígado y páncreas. ⁸
1921 a 1950	Cappell y McFarlane	Lograron demostrar que la enfermedad hemolítica y la eritroblastosis no se debían a la isoimmunización materna, adoptando el término "enfermedad por cuerpos de inclusión". ⁸
1950	Smith y Vellios	Consideraron que las CI eran la causa de la enfermedad. Apareciendo en la mayoría de los casos dentro de los 2 primeros años de vida y que podía aparecer en útero y podía ocasionar la muerte en útero o en el período neonatal. ⁸
1950	Smith y Vellios	El progreso en el diagnóstico de la enfermedad por inclusión citomegálica (EIC), comenzó la introducción de los métodos de la citología exfoliativa para detección de las CI (en orina y en otros líquidos).
1954	Smith	Logró propagar el virus de glándulas salivales en cultivos de tejido de embrión de ratón, después experimento en cepas de CMV humano aislado de las glándulas salivales y en riñón de dos niños. ⁸
1955	Smith	Se aisló por primera vez el CMV en una biopsia hepática de un paciente vivo (cepa Davis). ⁸
1960	Weller	Propuso el término de Citomegalovirus al considerar que no era correcto hablar de "enfermedad por un virus de glándulas salivales (EIC), ya que, las glándulas salivales son sitios posibles de la infección y además, el CMV es patógeno para el feto humano y es capaz de inducir una amplia variedad de anomalías oculocerebrales y extraneurales. ⁸

HISTORIA DE HERPES SIMPLES

Las infecciones herpéticas se han vuelto de mayor prevalencia durante las dos últimas décadas, las primeras descripciones van a épocas muy remotas.

AÑO	INVESTIGADOR	DESCUBRIMIENTO
100 d.C	Desconocido	Se cree el término herpes fue adoptado alrededor de este año (del griego, herpein; arrastrarse) en referencia a la naturaleza diseminante o expansiva. ⁴
?	Desconocido	El herpes labial data de la época de Hipócrates posteriormente se atribuye a Astruc, médico del rey de Francia. ⁴
1736	Desconocido	El herpes genital fue descrito por primera vez. ⁴
1910 y 1920	Desconocido	Entre estos años se demostró el carácter infeccioso de las lesiones mediante la producción de lesiones corneanas en conejos con material obtenido de lesiones de queratitis herpética y herpes labial. ⁴

CITOMEGALOVIRUS

CARACTERÍSTICAS

El virus contiene ADN con un peso molecular de $92 \text{ a } 102 \times 10^6$, una densidad de 1.27 a 1.29 g/mL en CsCl y un contenido G + C de 58%. Contiene un centro (*core*) de ADN rodeado por una cápside icosaédrica que contiene 162 capsómeros, y al mismo tiempo está rodeada por una envoltura que contiene glucoproteínas específicas del virus que desempeñan un papel muy importante en la adherencia y penetración del virus en la célula, también constituyen factores antigénicos capaces de inducir la producción de anticuerpos.²

Forma parte de los beta-herpesvirus. Tiene el genoma grande de todos los herpesvirus humanos; se multiplica sólo en células humanas en fibroblastos y macrófagos. El virus establece infección latente en linfocitos mononucleares, células de médula ósea y otras células como las epiteliales, en la cual produce inclusiones intranucleares e intracitoplásmicas de localización excéntrica, rodeadas por un halo claro, lo que les da un aspecto de "ojo de búho", aumentando de tamaño a la célula.¹

PATOGENIA E INMUNIDAD

En general, la patogenia de Citomegalovirus es similar a la de otros herpesvirus. El CMV comparte la capacidad para: (1) la diseminación célula a célula en presencia de anticuerpos circulantes; (2) el establecimiento de un estado de infección latente en el huésped, y (3) la reactivación en condiciones de inmunodepresión. Sin embargo, el CMV induce inmunodepresión transitoria en el receptor y suele establecer infección asintomática. Las infecciones persistentes se han dividido en tres categorías: 1ª infecciones latentes, caracterizadas por episodios intermitentes de enfermedad aguda, entre los cuales el virus no es demostrable; 2ª infecciones crónicas, en las cuales el virus es demostrable, pero en las cuales no existe sintomatología o ésta se asocia a algún desorden inmunológico; y 3ª infecciones lentas, caracterizadas por largos periodos de datos subclínicos o periodos de incubación muy prolongados.

El CMV guarda relación íntima con las células y es transmitido predominantemente por células infectadas, entre ellas linfocitos y otros leucocitos, que también diseminan el virus por todo el cuerpo. La asociación íntima con las células protege al virus frente a la inactivación mediada por anticuerpos. En la mayoría de los casos el virus se multiplica y se disemina sin causar síntomas.

El virus establece latencia en leucocitos mononucleares y en órganos como el riñón y el corazón. La infección latente por CMV parece ser reactivada por inmunodepresión (p. ej., corticosteroides, infección por VIH) y posiblemente por estimulación alogénica (es decir, la respuesta del huésped a las células transfundidas o trasplantadas). El virus se puede transmitir con las células en las transfusiones de sangre y los órganos trasplantados. La activación y replicación del virus en el riñón y las glándulas secretoras favorecen su eliminación en la orina y las secreciones corporales.

La inmunidad mediada por células es esencial para resolver y controlar la infección por CMV. De forma característica, la infección por CMV tiene efecto inmunodepresor. Esto puede ayudar al establecimiento de latencia y también prevenir la inmunopatogenia y los síntomas. La infección primaria por CMV causa un aumento de células T supresoras, con disminución de la relación entre células T facilitadoras y supresoras (CD4 y CD8). La función linfocítica (p. ej., respuesta proliferativas a los antígenos del CMV y los mitógenos) disminuye también durante la infección aguda, pero se normaliza a lo largo de la convalecencia.

DATOS CLÍNICOS

El CMV puede ser aislado en orina, sangre, exudados faríngeos, saliva, lágrimas, leche materna, semen, heces, líquido amniótico, secreciones vaginales, y cervicales, y tejidos usados para trasplante. Los medios principales para la transmisión de CMV se basan en las vías congénita, oral y sexual, así como en la transfusión de sangre y el trasplante de tejidos.

Infección congénita

El CMV representa la causa vírica común de enfermedad congénita puede producir la muerte del feto in útero , inclusiones citomegálicas, con signos de prematuridad, ictericia con hepatoesplenomegalia, púrpura trombocitopénica, neumonitis y daño del SNC que puede ir acompañado de microcefalia, calcificación, periventricular, coriorretinitis, atrofia óptica y retardo mental o motor. Las madres de casi la mitad de todos los lactantes con estos síntomas experimentaron infección primaria durante el embarazo. Parece que ocurre con frecuencia la infección inaparente intrauterina. La elevación de la cifra de anticuerpos IgM contra el Citomegalovirus o el aislamiento en orina del recién nacido.

Los fetos son infectados por los virus presentes en la sangre de la madre (infección primaria) o por los que ascienden desde el cérvix (después de una recidiva). En el momento del parto el lactante pasa a través del conducto del parto infectado y se infecta, aunque él posee títulos elevados de anticuerpo materno adquirido transplacentariamente. Los síntomas de infección congénita son menos intensos o no aparecen si la madre es seropositiva.

Infección perinatal.

En las embarazadas a término albergan CMV en el cérvix, y es probable que hayan experimentado reactivación del virus durante la gestación, alrededor de la mitad de los fetos nacidos a través de un cérvix infectado, adquieren la infección por CMV y comienzan a

excretar el virus a las tres o cuatro semanas de edad, también se puede adquirir a través de la leche materna o el calostro; aunque la infección perinatal no causa enfermedad clínicamente apreciable en lactantes sanos nacidos a término.

La transfusión de sangre constituye otro medio para la adquisición del CMV por los recién nacidos, de donantes seropositivos, adquieren la infección por CMV en el período postnatal inmediato y el contagio de lactantes prematuros puede provocar enfermedad clínica significativa, con neumonía y hepatitis como manifestaciones principales.

Infección en los adultos.

La infección por CMV después del período neonatal es frecuente en poblaciones de nivel socioeconómico bajo y en países subdesarrollados, al parecer como consecuencia de las condiciones de vida deficientes y el hacinamiento. En ausencia de estas condiciones sólo los adolescentes, y la cifra aumenta a los 35 años de edad. El virus se puede diseminar con la saliva, pero el retraso de la seroconversión hasta después de la adolescencia indica la importancia del contacto sexual y otras formas de contacto personal íntimo para la transmisión. El CMV ha sido aislado en el cérvix de las mujeres atendidas en clínicas de enfermedades venéreas, y se encuentra en el semen con títulos más elevados que en cualquier otra secreción corporal.

Si bien la mayoría de las infecciones por CMV adquiridas por los adultos jóvenes son asintomáticas, es posible el desarrollo de un cuadro clínico similar al de la mononucleosis infecciosa, aunque con adenopatías y laringitis menos graves. La infección por CMV favorece la proliferación de células T, con linfocitosis atípica, de modo similar al virus de Epstein-Barr (VEB), pero no induce la producción de anticuerpos.

Transmisión del virus a través de transfusiones y trasplante.

La transmisión de CMV con la sangre suele conducir a infección asintomática; si existen síntomas, en los casos típicos recuerdan a los de la mononucleosis infecciosa. La fiebre, la esplenomegalia y la linfocitosis atípica suelen comenzar entre tres y cinco semanas después

de la transfusión. También se pueden producir neumonía y hepatitis leve. El CMV puede ser transmitido con el trasplante de órganos (p. ej. , riñón o médula ósea), y el virus se puede reactivar en los receptores durante los períodos de inmunosupresión intensa.

La ocurrencia de enfermedad por citomegalovirus (CMV) en el paciente trasplantado de riñón está determinada principalmente por la presencia o no de títulos elevados de anticuerpos a CMV (IgG) e (IgM) en pacientes y donador antes del trasplante y por el tipo de inmunosupresión utilizada. En el receptor seropositivo, los títulos elevados de IgG varían considerablemente de paciente a paciente y esto posiblemente esté relacionado con la inmunocompetencia del enfermo. Revelan únicamente que el paciente ha estado expuesto al virus, consecuentemente que el portador del mismo, que hay predisposición a la enfermedad siendo impredecible en el caso de que se presente.

Una exposición aguda al virus se identifica por títulos elevados de IgM o por una elevación hasta cuatro veces mayor de los títulos basales de IgG, pero la forma de diagnosticar en forma oportuna la presencia del virus en sangre es por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹³

Infección del huésped inmunocomprometido.

El CMV es un agente infeccioso oportunista característico en los individuos inmunocomprometidos e inmunosuprimidos. Estos pacientes pueden sufrir también infección primaria, que en ellos provoca con más frecuencia enfermedad sintomática.

En los enfermos, puede reactivarse una infección latente cuando la susceptibilidad del huésped ante la infección está aumentada por la inmunosupresión. Aquellos que tienen reacciones serológicas negativas sin evidencia de infección previa por citomegalovirus, el virus puede transmitirse en forma exógena. Aproximadamente el 83% de los enfermos con reacciones serológicas negativas que recibieron injerto de riñón proveniente de donadores con reacciones serológicas positivas, desarrollaron infección. Por lo tanto, parece que los riñones resultaron ser el origen del virus.

Cuando los pacientes son seropositivos y los donadores seronegativos a CMV las posibilidades de desarrollar la enfermedad por reactivación del virus son bajas, oscilando

alrededor del 10 al 20% por lo tanto estos pacientes son clasificados de riesgo bajo para desarrollar la enfermedad.

Por lo contrario, cuando los donadores son seropositivos y los receptores son seronegativos, la posibilidad de infección primaria y de enfermedad clínica es elevada, particularmente durante los primeros meses después de la cirugía, aun con la terapia inmunosupresora habitual. Por lo tanto estos pacientes se consideran como de riesgo elevado señalándose un porcentaje del 50 al 80% de probabilidad para la enfermedad.

La posibilidad de superinfección se presenta cuando un paciente seropositivo recibe riñón o sangre de un donante también seropositivo. La posibilidad de reinfección por una cepa de virus diferente en este grupo es de alrededor de 50% y de un 20% al 40% de éstos pueden desarrollar la enfermedad, estos pacientes podrían ser considerados como de riesgo moderado.¹³

Además es una causa frecuente de retinitis en enfermos con inmunodeficiencia grave (p. ej., hasta el 10-15% de los pacientes con SIDA). La neumonía intersticial y la encefalitis pueden deberse también al CMV, y quizá sea difícil diferenciarlo de otros patógenos oportunistas. Hasta el 10% de los pacientes con SIDA desarrollan colitis o esofagitis por CMV. Un porcentaje menor de otros sujetos inmunocomprometidos experimenta infección del tracto gastrointestinal por CMV. La colitis por CMV suele cursar con diarrea, pérdida de peso, anorexia y fiebre. La esofagitis puede ser similar a la causada por *Candida*.¹⁶

INMUNIDAD

La respuesta inmune, tanto humoral como celular, es importante en las infecciones por CMV, en personas inmunocompetentes, casi toda enfermedad clínica esta relacionada con la infección primaria, pero puede existir la reactivación subclínica con excreción del virus por las secreciones cervicales o el semen, a pesar de elevados niveles circulantes de anticuerpos. Durante las infecciones primarias, la infección de los monocitos por el CMV produce una disfunción de estos fagocitos. En pacientes inmunocomprometidos, esto incrementa la predisposición a la sobre infecciones bacterianas o micóticas, así como las inclusiones y agrandamiento celular.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CITOMEGALOVIRUS

En la actualidad el CMV está distribuido por todo el mundo e infecta individuos de diversos orígenes, costumbres y nivel socioeconómico. Durante el primer año de vida, la adquisición del CMV es frecuente en los países subdesarrollados, en los cuales se ha encontrado que virtualmente el 100% de los niños está infectado antes del primer año de vida (Souther y col, 1984). En los EUA, el 20% de los infantes menores de un año, se infectan con CMV. Esta transmisión se realiza frecuentemente a través de la leche de madres infectadas, o por la fecalización ambiental y la falta de higiene adecuada (Villegas y col, 1984). Hasta hace algunos años, la posibilidad de contraer la infección por CMV disminuía notablemente después de los primeros años de vida, sin embargo en la actualidad, el uso de guarderías, jardines de niños, etc., parece estar cambiando este patrón, ya que la transmisión del virus parece realizarse fácilmente en niños que conviven.

La infección por CMV ha aumentado notablemente en los jóvenes, estando relacionado con el inicio de la actividad reproductiva y que depende del contacto íntimo y prolongado, así como la posibilidad de adquirir el CMV por vía sexual (Collier y col, 1987 a y b).

La revisión de los hallazgos presentados en la literatura hace evidente que durante los 75 años posteriores a su descubrimiento por Ribbert, la infección por CMV permaneció prácticamente restringida a los niños. Es aún evidente que el cuadro de mononucleosis infecciosa, es frecuente en el recién nacido por citomegalovirus congénita y menos frecuente en el lactante. Sin embargo a partir de 1960 empezaron a aparecer informes sobre la presencia de mononucleosis infecciosa por CMV en niños hasta de 11 años de edad (Ikeda y col, 1974).²

Cepas de CMV diferentes desde el punto de vista inmunológico, establecen la posibilidad de que algunos individuos sean susceptibles a infecciones, y sobre todo a reinfecciones, con diferentes cepas de CMV. Huang y colaboradores (1976) demostraron que las mujeres pueden padecer de reinfecciones de la mucosa del cuello uterino con más de una cepa de CMV. Los estudios actuales demuestran que en individuos con función inmunológica normal, la infección sistémica con CMV se efectúa habitualmente con una sola cepa del virus. Sin embargo, bajo condiciones especiales, algunos individuos pueden padecer

infecciones por cepas múltiples de CMV. Spector y colaboradores (1984) han sugerido que la infección por diferentes cepas del CMV puede desempeñar un papel importante en la evolución del SIDA, particularmente de los casos acompañados con sarcoma de Kaposi.

El crecimiento en la incidencia de CMV y la presencia de algunos factores que pudieron influir en este aumento son: los trasplantes renales, la perfusión sanguínea y la industrialización de la purificación del factor VIII para su administración a hemofílicos. Otros factores más difíciles son indudablemente la transmisión sexual de la infección por citomegalovirus, particularmente entre homosexuales y por agujas contaminadas entre drogadictos.

Al iniciarse la utilización de la bomba de perfusión sanguínea para la realización de cirugía con circulación extracorpórea, se observó la aparición de un cuadro patológico, caracterizado por fiebre, esplenomegalia, anemia, pruebas hepáticas anormales, en ocasiones ictericia, tos, leucocitosis con linfocitosis o leucopenia. La participación etiológica del CMV en este cuadro, semejante en todo a la mononucleosis infecciosa, fue demostrada primero por estudios serológicos y finalmente por el cultivo del virus (Klemola y col, 1967 y 1969). Es importante señalar que la mononucleosis posperfusión se ha incrementado del 3 al 11% (Paaloheimo y col, 1968).²

En el año de 1960 en que fue publicada la descripción de este síndrome posperfusión, se publicó en Suecia un estudio estadístico que demostraba, en un hospital de enfermedades infecciosas de ese país, un incremento notable en la presentación de mononucleosis infecciosa entre 1940 y 1957 (Sacrez y col, 1960).

La capacidad que tiene el CMV, junto con otros miembros del grupo *herpetoviridae*, de persistir durante muchos años en el huésped después de la primera infección, es de gran importancia biológica (Mims, 1982).

Esta capacidad de mantenerse en estado de latencia ha sido estudiada particularmente en animales. Aunque la evidencia es menos directa en el humano, es bastante claro que el CMV puede permanecer también en estado de latencia prolongada y ser reactivado por diferentes causas.

Algunos estudios demuestran que el CMV es capaz de mantenerse persistentemente en los linfoblastos de la estirpe de células B (Schrier, 1985). El CMV también parece ser

capaz de establecerse persistentemente en muchos otros órganos, lo cual puede demostrarse por la relación que existe entre el trasplante de órganos y la infección citomegálica. Sujetos sometidos a trasplante renal frecuentemente desarrollan síntomas de infección citomegálica después del procedimiento quirúrgico (Stevens y Col, 1970).²

TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL

El ganciclovir (dihidroxihipoximetilguanina [DHIPGI, Cytovene) y el foscarnet (ácido fosfonóformico) han sido aprobados para tratamiento de las infecciones por CMV, y tienen utilidad especial en los pacientes inmunodeprimidos. El ganciclovir, similar al ACV desde el punto de vista estructural, es activado de modo parecido, pero resulta más tóxico. El ACV no es eficaz contra los CMV. *In vitro*, el ganciclovir muestra actividad contra todos los herpesvirus humanos. Se puede emplear para tratar las infecciones graves por CMV en pacientes inmunocomprometidos. El foscarnet es una molécula simple que inhibe al ADN polimerasa al imitar la porción pirofosfato de los trifosfatos de nucleótidos. Ha sido aprobado como una alternativa para el ganciclovir.

Las principales vías previsible para el contagio de CMV son el trasplante de tejidos, la transfusión de sangre y la sexual; como el semen que representa un vector fundamental para la diseminación del CMV durante contactos tanto heterosexuales como homosexuales. El empleo del preservativo y la abstención del coito anal limitan el riesgo de contagio, la transmisión del virus se podría disminuir también utilizando sólo sangre y órganos de donantes seronegativos para CMV, tiene importancia especial cuando se administran transfusiones de sangre a los lactantes.

Aunque no es posible prevenir con efectividad la transmisión congénita y perinatal de CMV, las mujeres seropositivas experimentan menos riesgo de tener un hijo con enfermedad sintomático por el virus.

Se han preparado vacunas con CMV vivos atenuados, que inducen formación de anticuerpos, así como inmunidad mediada por células. Sin embargo, no se conoce la duración de la inmunidad, el nivel de protección contra infecciones futuras ni el riesgo de oncogénesis relacionado con la vacuna, se está considerando la posibilidad de vacunas de

virus muertos, subunidades e híbridos con vaccina, como alternativas. Los principales candidatos para la vacunación contra el CMV podrían ser los niños y mujeres seronegativas en edad fértil, similares a los de la vacuna antirubeólica.¹

HERPES SIMPLE

CARACTERÍSTICAS

Existen dos tipos de virus de herpes simples (VHS) epidemiológica y antigénicamente distintos (VHS-1 y VHS-2). Son virus que contienen ADN lineal de doble cadena con peso molecular de $85-106 \times 10^6$, poseen cápside proteica en forma icosaédrica de 100 nm, constituida de 162 capsómeros, cada uno parece tener una longitud de 12.5 nm y 8.5 nm de diámetro con orificio central de 4 nm, rodeada de una membrana externa. Entre la cápside y la cubierta se le llama el tegumento, el tamaño varía considerablemente entre los herpesvirus, además de poseer una envoltura que contiene lípidos, carbohidratos y proteínas, rápidamente es eliminada por el tratamiento con éter. El contenido de guanina + citosina es de 66-70%. Los tipos 1 y 2 muestran 50% de homología en la secuencia.⁶

El genoma del VHS es suficientemente grande para codificar alrededor de 80 proteínas. Entre ellas se incluyen proteínas de unión de ADN, que coordinan y favorecen la transcripción y replicación del ADN. También codifica enzimas, como la ADN Polimerasa, ADN dependiente y las depuradoras, por ejemplo, desoxirribonucleasa, timidina cinasa y ribonucleótido reductasa. Así como otras. La ribonucleótido reductasa convierte los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, y la timidina cinasa fosforila los desoxirribonucleótidos a fin de suministrar sustratos para replicación del genoma vírico. Los sustratos específicos de estas enzimas y de la ADN Polimerasa difieren en forma significativa de los de sus análogos celulares y, por tanto, representan buenas para el desarrollo de agentes antivíricos.

El VHS codifica por lo menos 11 glucoproteínas que actúan como proteínas de adherencia vírica (gB, gC, gD, gH), fusión (gB), estructurales, de escape inmune (gC, gE, gI) y otras funciones. Ambos virus comparten antígenos en casi todas sus glucoproteínas de superficie y otros polipéptidos estructurales, existen numerosas cepas, tanto de VHS-1 y VHS-2. En realidad mediante análisis de restricción por endonucleasas del genoma vírico se ha comprobado que la mayoría de las cepas de VHS-1 o de VHS-2 difieren en cierta medida, excepto en casos relacionados epidemiológicamente, como transmisión madre-hijo o por contagio sexual.⁶ Los dos tipos de VHS, 1 y 2, comparten muchas características.

entre ellas homología del ADN, determinantes antigénicos, tropismo tisular y síntomas de enfermedad. Sin embargo, también se pueden distinguir por diferencias en estas propiedades.¹

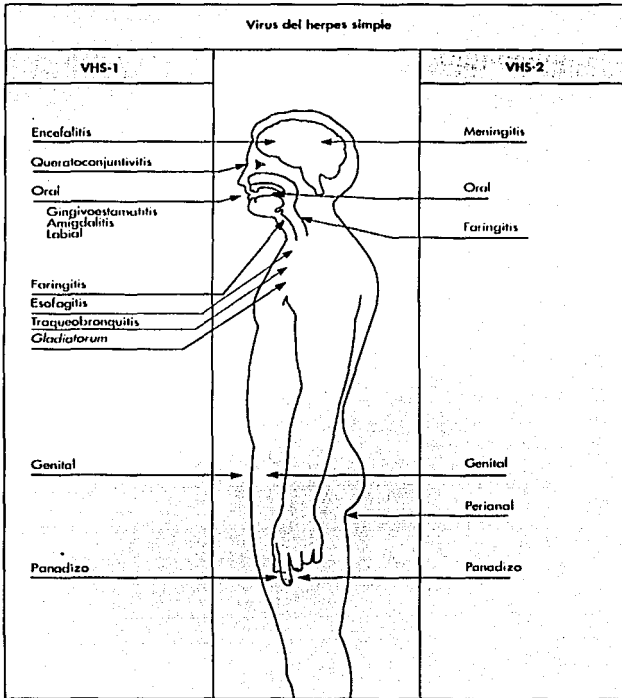


FIG. 1. Síndromes causados por los virus del Herpes Simple, el VHS-1 y VHS-2 pueden infectar los mismos tejidos y causar enfermedades similares, pero muestran predilección por los sitios indicados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DIFERENCIACIÓN DE LOS TIPOS 1 Y 2:

Herpesvirus simple tipos 1 y 2 dan reacciones séricas cruzadas, pero pueden ser distinguidos por numerosas pruebas: (1) El uso de antisuero específico del tipo, preparado por la adsorción del antisuero viral con células infectadas de manera heterotípica o mediante la inoculación de conejos con proteínas individuales específicas de tipo. (2) La mayor sensibilidad térmica de la efectividad del tipo 2. (3) La preferencia del desarrollo en diferentes especies de células. (4) Los patrones de restricción enzimática de las moléculas del ADN viral. (5) Las diferencias de los polipéptidos producidos por el tipo 1 y por el tipo 2.

MECANISMOS DE INFECCIÓN AGUDA Y LATENTE

El VHS produce tanto infecciones agudas como latentes, en las cuales la interacción virus-célula y las manifestaciones de la infección difieren. Pueden producir diferentes entidades clínicas y las infecciones primarias ocurren en personas sin anticuerpos y resultan a menudo porque el virus asume un estado latente en los ganglios sensoriales del huésped. Las infecciones latentes persisten en personas con anticuerpos y las infecciones recurrentes son las más comunes.

La infección primaria en la mayoría de los individuos es clínicamente imperceptible pero va acompañada en forma invariable de la producción de anticuerpos. A los ataques recurrentes en presencia de los anticuerpos virales neutralizantes, siguen a menudo estímulos inespecíficos tales como la exposición del exceso de sol, la fiebre, la menstruación o el stress emocional.

La reactivación del virus ocurre a pesar de la presencia de anticuerpos. El stress desencadena la reactivación que puede tener efecto doble:

(1) favorecer la replicación del virus en el tejido nervioso y (2) deprimir transitoriamente la inmunidad mediada por células. La activación de células memoria, la respuesta de anticuerpos y la presencia de inmunidad local resuelven la infección con más rapidez que durante la primera exposición.^{1,5}

DATOS CLÍNICOS

Tanto el VHS-1 como el VHS-2 son patógenos comunes que pueden causar lesiones dolorosas, pero benignas, y enfermedad recurrente. La presentación clínica es una vesícula clara sobre una base eritematosa (una gota de rocío en un pétalo de rosa), que progresa hacia lesiones pustulosas, úlceras y lesiones costrosas. Sin embargo, ambos virus pueden causar morbilidad y mortalidad significativas cuando infectan el ojo, el cerebro, o provocar infección diseminada en los individuos inmunodeprimidos recién nacidos.¹

El Herpes oral puede deberse al VHS-1 o el VHS-2. La gingivostomatitis herpética primaria de los niños de 3-5 años, es causada casi siempre por el VHS-1, mientras que los adultos jóvenes pueden ser infectados por el tipo 1 o el 2. Las lesiones comienzan como vesículas claras, pero se ulceran con rapidez. Estas áreas blanquecinas pueden estar ampliamente distribuidas en la boca, con afectación del paladar, la faringe, las encías, la mucosa bucal y la lengua. Las lesiones son bastante dolorosas y en general la enfermedad dura 5-12 días.

Los individuos pueden experimentar infección mucocutánea recurrente por herpes simple labios o el área perioral de la cara (herpes labial), típicamente son unilaterales; incluso aunque no hayan presentado nunca antes infección primaria clínicamente aparente. El virus es activado en general desde los ganglios trigéminos. Los síntomas de los episodios recurrentes son más moderados que los de la infección primaria, más localizados y más breves, a causa del desarrollo de inmunidad parcial. El episodio dura en general alrededor de 7 días. Hay que destacar que el VHS puede reactivarse y ser excretado por la saliva sin la presencia de lesiones mucosas aparentes.

La **faringitis herpética** se está convirtiendo en un diagnóstico virológico frecuente entre los adultos jóvenes. La **estomatitis grave** por VHS, que recuerda a la gingivostomatitis primaria, puede afectar a pacientes inmunodeprimidos por enfermedad o terapia.

La **queratitis herpética** se limita casi siempre a un ojo. Puede causar enfermedad recurrente que conduce a fibrosis permanente, lesión corneal y ceguera.

El **panadizo herpético** es una infección de los dedos, es frecuente en enfermeras o médicos que atienden a pacientes con infecciones por VHS, en los niños que se chupan el pulgar y

en individuos con infección genital por VIH, penetrando a través de cortes o abrasiones cutáneas, mientras que el **herpes gladiatorum** afecta el cuerpo y se adquiere muchas veces por contacto corporal durante la lucha, por ejemplo en dedos de dentistas, personal hospitalario y en los cuerpos de los luchadores.

El **eccema** herpético afecta a niños con eccema activo. La enfermedad subyacente favorece la diseminación de la infección a lo largo de la piel e incluso a las glándulas adrenales, el hígado y otros órganos.

El **herpes genital** se puede deber al VHS - 1 (responsable del 10% de las infecciones genitales) o al VHS-2. Es una enfermedad de transmisión sexual importante, la mayoría de estas infecciones genitales primarias son asintomáticas, cuando existen las lesiones varían en número y suelen ser dolorosas. Las lesiones típicas de los hombres se localizan en el glande o el cuerpo del pene, y a veces en la uretra; las lesiones de las mujeres se pueden ver en vulva, vagina, cérvix, área perianal o la superficie interna del muslo, y se acompañan muchas veces de prurito y exudado vaginal mucoso. La infección primaria se puede acompañar de fiebre, malestar general, mialgia, síntomas relacionados con una viremia transitoria, donde la presencia de anticuerpos contra el VHS- 1 alivia los síntomas. Se compara la sintomatología y el curso cronológico del herpes genital primario y recurrente.

La enfermedad genital recurrente por VHS es menos grave que los episodios primarios. Las recidivas se deben a reactivación de virus latentes en un ganglio sacro. Casi todas las recidivas se deben al VHS-2. En aproximadamente la mitad de los pacientes, las recidivas están precedidas por quemazón u hormigueo en el área donde aparecerán las lesiones. Los episodios se pueden repetir hasta cada dos o tres semanas o con mucha menos frecuencia. Algunos estudios epidemiológicos y de biología molecular han demostrado una asociación entre el VHS-2 y el carcinoma cervical. Estudios recientes han relacionado a otro patógeno genitourinario más estrechamente con estos tumores, el virus del papiloma humano (VPH) de las verrugas genitales.

No obstante, cualquier individuo infectado puede eliminar virus aunque no presente síntomas. Estos sujetos pueden actuar como vectores importantes para la diseminación del virus.

La **proctitis** por VHS puede afectar a hombres homosexuales. Las lesiones son dolorosas y se pueden encontrar en la parte distal del recto y el ano.

La **meningitis** por VHS suele ser una complicación de la infección genital por VHS-2. Ocurre dentro de los diez días siguientes a la infección primaria. El cuadro se caracteriza por rigidez de nuca intensa, junto con otros signos de meningitis, como cefalea, fotofobia y náuseas. Los síntomas se resuelven pronto de modo espontáneo.

La **encefalitis herpética** es una enfermedad febril aguda, causada habitualmente por el VHS- 1, las lesiones se limitan en general a uno de los lóbulos temporales y la actividad del virus y la inmunopatología producen destrucción del lóbulo temporal y dan lugar a la presencia de hemáties en el líquido cefalorraquídeo, convulsiones, signos neurológicos focales y otros datos de encefalitis vírica. La enfermedad puede parecer un absceso cerebral, un tumor cerebral o una hemorragia intracerebral.

La encefalitis herpética esporádica fatal es más común y conduce a la muerte en el 50% de los casos, la cual se encuentra en todos los grupos de edad y en cualquier época del año.

La **infección del recién nacido por VHS** es una enfermedad devastadora, generalmente mortal, causada la mayoría de las veces por el VHS-2 pero también puede ser por VHS-1. Se pueden adquirir *in útero* pero es más frecuente el contagio durante el paso a través del canal genital, cuando la madre elimina herpesvirus en el momento de parto; a falta de una respuesta inmune celular desarrollada, el VHS se disemina hasta el hígado, el pulmón y otros órganos, así como el sistema nervioso central. La infección trasplacentaria del feto con los tipos 1 y 2 de herpesvirus simple puede causar malformaciones congénitas, pero este fenómeno es raro. Los lactantes gravemente afectados que sobreviven pueden tener daño encefálico permanente. Para evitar la infección, se ha usado la extracción cesárea en embarazadas con lesiones herpéticas en los genitales, y la posibilidad de ser el agente que produzca el rechazo de trasplante de órganos sobre todo el VHS tipo 1, aunque aún no se conoce si el VHS tipo 2 está involucrado.^{1,5,6}

PATOGENIA

Los VHS son transmitidos a través del contacto con lesiones o secreciones infectadas, siendo el período de incubación es de 2-14 días, los cambios patológicos durante las infecciones agudas consisten en el desarrollo de células gigantes multinucleadas, balonización degenerativa de las células epiteliales, necrosis focal, cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilas y una respuesta inflamatoria caracterizada por un infiltrado inicial de neutrófilos polimorfonucleares y un infiltrado posterior de células mononucleadas, que puede diseminarse entre las neuronas o dentro de éstas o a través de la red celular de soporte de un axón o un nervio, produciendo la infección latente de los ganglios de los nervios autónomos y sensitivos. En el hombre, la infección latente por VHS-1 se ha demostrado mediante técnicas de cultivo en ganglios de los nervios trigéminos, cervical superior y vago y, en ocasiones, en los ganglios de las raíces de los nervios sensitivos dorsales S₂-S₃, la infección latente por VHS-2 se ha demostrado en la región sacra (S₂-S₃).

La reactivación del virus de las células ganglionares infectadas, en forma latente, con la posterior liberación de viriones infectivos, parece ser la responsable de la mayoría de las recurrencias, tanto de las infecciones genitales como de las orolabiales. Los mecanismos por los cuales, se mantienen o se reactivan las infecciones latentes son desconocidos. Se han postulado dos teorías alternativas para explicar cómo el virus latente alcanza la periferia. De acuerdo con la teoría ganglionar, cambios metabólicos en las células infectadas de forma latente, "ponen en marcha" el ciclo replicativo vírico; el virus viaja entonces a lo largo de los nervios periféricos hasta la piel, en donde se replica en las células epidérmicas y produce las lesiones. Una explicación alternativa, la teoría del desencadenante cutáneo, sugiere la multiplicación crónica del virus en el ganglio, con diseminación intermitente de los virus a lo largo del axón nervioso hasta la piel. Las alteraciones locales en el estado inmunitario del huésped facilitan la replicación en la piel. Los factores desencadenantes que inician la reactivación del VHS son prácticamente desconocidos; la exposición a la luz ultravioleta es importante en ciertos pacientes con herpes orolabial recurrente. Experimentalmente, el herpes mucocutáneo puede ser producido por la reinfección exógena con cepas diferentes del mismo subtipo, pero no es frecuente en condiciones naturales.⁵

INMUNIDAD

Los factores del huésped poseen un efecto determinante sobre las manifestaciones clínicas de la infección por VHS. Muchos episodios de infección por VHS son asintomáticos o cursan con síntomas moderados. Los episodios iniciales clínicamente sintomáticos de la enfermedad son más graves que los episodios recurrentes, al parecer a causa de la presencia de anticuerpos anti-VHS y linfocitos inmunes en individuos con infecciones recurrentes. Una infección previa por VHS-1 acorta la duración de los síntomas y reduce la gravedad de las primeras infecciones por VHS-2.

La respuesta inmune, tanto celular como la humoral, es importante en la inmunidad frente al herpes. Experimentalmente, puede demostrarse que el anticuerpo neutralizante anti-VHS inactiva el virus extracelular; sin embargo, la persistencia de transmisión vírica por medio de transferencia célula a célula ayuda a explicar la recurrencia del VHS en presencia de elevados títulos de anticuerpo neutralizante. También se ha demostrado que la inmunidad mediada por células retarda la replicación del virus y la recurrencia del VHS son clínicamente de menor duración y más localizadas que las infecciones primarias. En pacientes inmunodeprimidos, en especial los que presentan una depresión de la inmunidad mediada por células, la reactivación del VHS puede asociarse a una excreción prolongada del virus y a la persistencia de las lesiones. Se ha demostrado que, en ocasiones, se producen viremia y diseminación por los órganos viscerales, incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-VHS detectables.

Muchos recién nacidos tienen anticuerpos maternos transferidos en forma pasiva. Estos anticuerpos se pierden durante los primeros seis meses de vida, así que el periodo de mayor susceptibilidad a la infección herpética primaria está comprendido o entre los 6 meses y los 2 años de edad. Los anticuerpos al herpesvirus simple tipo 1 comienzan a aparecer en la población en los niños preescolares; en la adolescencia se encuentran en la mayoría de las personas. Los anticuerpos contra el herpesvirus simple tipo 2 (herpesvirus genital) ascienden durante la edad de la adolescencia y de la actividad sexual.^{5,6}

EPIDEMIOLOGÍA

Los VHS tienen una distribución mundial, no existen animales ni vectores conocidos, y el hombre parece ser el único reservorio natural; el contacto directo con secreciones infectadas constituye el principal modo de transmisión.

La capacidad del VHS para establecer infección latente con posibilidad de recidivas asintomáticas, permite que un individuo se convierta en fuente de contagio durante toda su vida. Como virus con envoltura, el VHS es muy lábil y resulta inactivado con facilidad por la desecación, los detergentes y las condiciones del tracto gastrointestinal. Aunque el VHS puede infectar células animales, sólo produce enfermedad humana.

El VHS se transmite por el líquido de las vesículas, la saliva y las secreciones vaginales, el VHS-1 se suele diseminar por contacto oral (beso) o al compartir vasos, cepillos de dientes y otros objetos contaminados con saliva, en el caso de infección de los dedos o el cuerpo por VHS-1 se puede deber a contacto boca-piel, penetrando a través de fisuras en la piel y la autoinoculación puede causar también infección de los ojos.

La infección por VHS-1 es común en áreas subdesarrolladas, la prevalencia de anticuerpos contra el VHS-1 es superior al 90% a los dos años de edad, esto refleja hacinamiento o falta de higiene.

El VHS-2 se disemina principalmente por contacto sexual, autoinoculación o durante el paso del feto por el canal del parto infectado, dependiendo de los hábitos sexuales, el VHS-2 puede infectar los genitales, los tejidos ano-rectales o la orofaringe.

La infección inicial por VHS-2 ocurre más tarde a lo largo de la vida que las causadas por VHS-1, y guarda relación con la actividad sexual, donde la sepositividad para VHS-2 oscila desde menos del 1% para los estudiantes recién ingresados en la escuela superior, del 15% al 20% para los adultos de niveles socioeconómicos medios y superiores, del 40% al 60% para los grupos socioeconómicos más bajos y el 80% para las prostitutas. En la mayoría de los países subdesarrollados el 90% de la población de alrededor de 30 años tiene anticuerpos VHS-1 y en E.E.U.U. se encuentra habitualmente el anticuerpo VHS-1 en cerca del 50-60% de los individuos de clase media, entre los grupos socioeconómicos inferiores,

sin embargo, este porcentaje alcanza el 90%. Alrededor del 20-35% de los adultos sexualmente activos de los países occidentales industrializados poseen anticuerpos VHS-2. El virus puede aislarse del cuello y la uretra en el 5-12% de adultos que son atendidos en las clínicas de enfermedades de transmisión sexual, la mayoría de estos pacientes están asintomáticos. En Londres mostraron seropositividad el 54% de los mayores de 25 años y en la Ciudad de México el 86% de mujeres embarazadas de 20 a 40 años poseen anticuerpos contra este virus.^{1,5,7}

TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL

El VHS codifica enzimas para fármacos antivíricos. La mayoría de los medicamentos anti-herpéticos son análogos de los nucleótidos o inhibidores de ADN polimerasa vírica, una enzima esencial para la replicación del virus y la mejor diana para el tratamiento antivírico. Los fármacos anti-herpes aprobados por la FDA incluyen aciclovir (ACV), foscarnet (ácido fosfonofórmico), vidarabina (arabinósido de adenosina), idoxuridina (yododesoxiuridina) y trifluridina.

El aciclovir (ACV) es en la actualidad el fármaco anti-VHS más efectivo, es activado por la timidina cinasa vírica y después usado como sustrato por la ADN polimerasa vírica, que se incorpora en el ADN vírico e impide su elongación. El aciclovir se muestra eficaz en el tratamiento de los cuadros graves por VHS, para los primeros episodios de herpes genital y como agente profiláctico; está indicado en los síndromes graves por VHS, como enfermedad neonatal, encefalitis y diseminación extensa en pacientes inmunodeprimidos, este fármaco es relativamente atóxico y se puede emplear con fines profilácticos. La forma más frecuente de resistencia al ACV se debe a mutaciones que inactivan la timidina cinasa, lo que reduce la conversión del fármaco en su forma activa. Por fortuna, las cepas resistentes parecen ser menos virulentas.

El arabinósido de adenina (Ara A) está aprobado también para tratamiento de la infección por VHS, sin embargo, el Ara C es menos soluble, menos potente y más tóxico

que el ACV, la trifluridina y el aciclovir han sustituido a la yododesoxiuridina como fármacos tópicos para la queratitis herpética. La tromantadina, un derivado de la amantadina, está aprobada para uso tópico en países distintos de Estados Unidos, e inhibe la penetración y la formación de sincitios. El interferón tópico también puede ser efectivo contra el VHS. Ningún tratamiento evita el establecimiento de la infección latente ni la elimina.

El VHS-1 se transmite la mayoría de las veces desde una lesión mucocutánea activa, de forma que es posible reducir la infección si se evita el contacto directo con tales lesiones. No obstante, a veces no existen síntomas y, por tanto, el virus se puede transmitir sin advertir su presencia.

Los médicos, las enfermeras, los odontólogos y los técnicos de laboratorio deben tener cuidado especial durante la manipulación de tejidos o líquidos posiblemente infectados, los guantes pueden evitar la infección de los dedos (panadizo herpético), cuando es recurrente son muy contagiosos y pueden diseminar la infección a los pacientes, este riesgo de contagio se evita fácilmente mediante lavado con jabón.

Los pacientes con historia de infección genital por VHS deben ser instruidos para que prescindan de las relaciones sexuales cuando notan lesiones o síntomas prodrómicos, sólo pueden reanudar esas relaciones cuando las lesiones se han reepitelizado por completo, puesto que es posible aislar el virus incluso en las lesiones costrosas. Los preservativos pueden resultar útiles e indudablemente son mejores que nada, pero no ofrecen protección completa.

Si una embarazada padece infección genital activa por VHS al final de la gestación y no se han roto las membranas, la cesárea evita el contacto del lactante con lesiones infectadas por el virus. No obstante, como ya se ha dicho el virus puede estar presente en las secreciones genitales sin producir síntomas, y el parto vaginal puede provocar contagio del recién nacido.

Se han obtenido vacunas de virus muertos, subunidades e híbridos con *vaccina*, que todavía están siendo objeto de evaluación, las cuales podrían prevenir la infección o establecer latencia, o mejorar las recidivas. ¹

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Los primeros indicios para establecer el diagnóstico de una infección vírica se obtienen de la historia y los síntomas del paciente, y mediante exclusión de otros tipos de infección (por ejemplo, bacteriana, micótica). Los estudios de laboratorio pueden confirmar el diagnóstico e identificar el agente vírico causal de la infección y la identificación de un virus puede dirigir la elección de la terapia apropiada, y es útil para definir el proceso patológico, la vigilancia epidemiológica y la educación de médicos y pacientes.

La confirmación en el laboratorio del diagnóstico de la infección vírica se puede establecer mediante los siguientes métodos: citología, microscopía electrónica, aislamiento y cultivo de los virus, detección de los virus por métodos serológicos, detección de material genético vírico.

CITOLOGÍA/HISTOLOGÍA

El examen citológico de muestras puede proporcionar un diagnóstico inicial rápido para aquellos virus que producen un efecto histopatológico (ECP) característico, que incluyen cambios de morfología celular, lisis, vacuolización, formación de sincitios y presencia de cuerpos de inclusión; estos cuerpos de inclusión son cambios histológicos de las células causados por la presencia de componentes víricos, o modificaciones de las estructuras celulares inducidas por el virus. Las inducciones de Cowdry tipo A en células únicas o en grandes sincitios (fusión de múltiples células) son características del virus del herpes simple y para citomegalovirus las infecciones pueden causar cuerpos de inclusión tipo ojo de búho nucleares en las células de tejidos o en el sedimento urinario.

Histología: El dato histológico característico de la infección por CMV es la célula citomegálica, que tiene un tamaño grande (25 a 35 μ m) y contiene una inclusión intranuclear basófila central densa («ojo de lechuga o búho»), se pueden encontrar estas células infectadas en cualquier tejido del cuerpo y en la orina, y se cree que son de origen epitelial, se ven fácilmente con la tinción de Papanicolaou o con hematoxilina y eosina.

La prueba de Tzanck sirve para examinar células obtenidas con raspado en la base de las lesiones sospechosas de herpes y de las lesiones cutáneas de varicela.

Las células se extienden sobre un porta, se fijan y se tiñen con los colorantes de Wright o Giemsa, el examen citológico es sugestivo, pero no concluyente y se puede establecer la presencia con rapidez de VHS mediante demostración de antígenos (inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa) o ADN (hibridación *in situ*) del virus en una biopsia o extensión de Tzanck.^{1,9}

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica no es una técnica de laboratorio clínico estándar, pero se puede usar para la detección e identificación de algunos virus. Para examinar el tejido de una biopsia o la muestra clínica apropiadamente procesadas, en busca de estructuras víricas.¹

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LOS VIRUS

El cultivo ha sido considerado en general como el método definitivo para diagnosticar la infección por CMV, ya que ofrece fiabilidad especial en los pacientes inmunocomprometidos, puesto que muchas veces presentan títulos elevados del virus en sus secreciones, por ejemplo, los enfermos con SIDA pueden exhibir títulos superiores a 10⁶ virus viables en el semen.

El CMV sólo crece en cultivos de fibroblastos diploides, que deben ser mantenidos por lo menos durante cuatro a seis semanas, puesto que los ECP característicos aparecen muy lentamente si las muestras tienen títulos bajos del virus. Es posible conseguir resultados más rápidos mediante amplificación del cultivo de una muestra, que son inoculadas mediante centrifugación en un vial con células fibroblásticas diploides y se examinan al cabo de uno o dos días de incubación por inmunofluorescencia indirecta para el antígeno precoz inmediato (API) o una combinación de API y antígeno precoz (AP).

La tipificación de los aislamientos de VHS se puede realizar mediante técnicas bioquímicas, biológicas o inmunológicas, los patrones obtenidos con endonucleasa de restricción del ADN de los VHS- 1 y VHS-2 son únicos, y permiten la tipificación inequívoca de los aislamientos. También se dispone de anticuerpos y sondas de ADN

específicos para el tipo de VIH, que permiten detectar y diferenciar entre VIH- 1 y VIH-2.¹

SEROLOGÍA

La respuesta inmunológica del paciente ante las infecciones virales permite reconocer, mediante procedimientos serológicos, las infecciones que un individuo ha experimentado ya que los anticuerpos pueden ser identificados en los fluidos humorales.

Los procedimientos serológicos tradicionales conocidos y de uso común en los laboratorios, pueden ser empleados para identificar:

- a. A un virus, sus cepas o serotipos
- b. Una infección reciente
- c. Entre infección primaria o secundaria
- d. Si se trata de una infección aguda o pasada.

Los primeros anticuerpo producidos por el sistema inmune como consecuencia de una infección viral, están dirigidos contra los antígenos presentes en la superficie del virión. Aparecen las globulinas de clase IgM, de duración transitoria (de días a pocos meses) y de clase IgG que en general duran más tiempo (de meses a años e incluso de por vida). Posteriormente en el curso de la infección, cuando las células ya han sido lisadas por efecto del virus infectante, o por la respuesta inmune celular, los anticuerpos están dirigidos contra otras proteínas virales y las enzimas.⁹

Seroconversión. Se dice que hay seroconversión cuando se demuestra el incremento en por lo menos cuatro veces entre el título de anticuerpos presente en el suero tomado durante la fase aguda de la enfermedad y en otra muestra del mismo paciente 3-4 semanas más tarde. La identificación de IgM específica se asocia también con una infección reciente.

Cuando se decide utilizar procedimientos serológicos con fines diagnósticos según la clase de inmunoglobulinas, se utilizan las opciones siguientes:

1. **Pares de sueros.**- Se colectan 2-3 mL de suero sanguíneo durante la fase aguda de la enfermedad, seguido por la toma de una segunda muestra 3-4 semanas después. En estas muestras se va a demostrar seroconversión y los anticuerpos medidos son de clase IgG.
2. **Muestra única:** Se colecta 2-3 mL de suero entre los 6-20 días de haber iniciado la sintomatología. En esta muestra se van a identificar globulinas de la clase IgM específica y tienen duración transitoria.

Interpretación de los resultados serológicos

Los anticuerpos de virus específicos de tipo IgM generalmente se elevan durante las primeras 2 a 3 semanas de ocurrida la infección, clínica o subclínica, y persisten por varias semanas y en algunos casos hasta algunos meses, siendo reemplazados por anticuerpos IgG. Así que un título de anticuerpos específicos IgM sugiere una infección reciente de tipo primario y se puede demostrar su disminución o su desaparición en una segunda muestra. La demostración de IgM específica ha sido usada con éxito en el diagnóstico de infecciones por virus CMV y es el procedimiento de elección para establecer la ocurrencia de una infección reciente.

Limitaciones:

1. Actualmente se acepta que la respuesta de IgM específica no es exclusiva de una infección primaria y la reactivación de infecciones endógenas puede resultar en respuestas de IgM, particularmente en casos de infecciones con herpesvirus.
2. Cuando los pacientes continúan produciendo IgM para el virus de la rubéola o al citomegalovirus, durante varios meses después de la infección primaria.
3. También puede conducir a confusión de interpretación cuando en una muestra sérica colectada en el curso de una enfermedad se demuestra IgM específica para varios antígenos y el problema sería entonces de encontrar la asociación etiológica correcta.
4. Otro tipo de problema son los resultados falsos negativos a bajo título de IgM causados por competencia con anticuerpos IgG presentes a altos títulos para otras entidades virales, y las reacciones falsas positivas que resultan de la presencia de factor reumatoide en las

muestras. Ambos tipos de errores parecen ocurrir con mayor frecuencia empleando inmunofluorescencia o ELISA.

5 La seroconversión puede no ser demostrada en casos particulares como son los niños inmunodeficientes, o cuando el suero se colecta muy tarde en el curso de la enfermedad o muy al inicio, antes de que se produzcan.

La metodología serológica de uso actual se apoya fundamentalmente en dos métodos, los de neutralización (especialmente cuando el virus tiene capacidad hemaglutinante) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Con estos últimos se puede identificar la presencia de IgM específica mediante métodos de captura.

Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

1. Se aplican dos tipos de enfoques, la determinación de anticuerpos totales (mezcla de todos los isotipos) o de clases en particular (IgM, IgG o IgA) contra el virus que se está determinando.
2. Se realiza usando un antígeno inmovilizado en una superficie de plástico, perla o filtro, para capturar y separar el anticuerpo específico contra el virus, de otros anticuerpos presentes en el suero del paciente. El anticuerpo del paciente fijado se detecta después mediante un anticuerpo antihumano unido a una enzima por ejemplo peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa. Se cuantifica espectrofotométricamente por la intensidad del color de un sustrato apropiado, causado por la acción enzimática. Las muchas variaciones de la técnica de ELISA difieren en los medios para capturar y detectar el anticuerpo o el antígeno. Según la marca del reactivo.

DETECCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO VÍRICO

La estructura y la secuencia genética del genoma representan una característica distintiva fundamental de la familia, el tipo y la cepa de virus, los patrones de ARN o ADN son

similares a las huellas digitales genéticas de esos virus, la separación electroforética de segmentos de ARN genómico o productos digeridos con endonucleasa de restricción de virus de ADN genómico, de esta forma se puede distinguir también entre diferentes cepas de virus del herpes simple tipos 1 y 2.

Se puede usar sondas ADN con secuencias complementarias para regiones específicas de un genoma vírico, a fin de detectar, localizar y cuantificar ácidos nucleicos víricos en muestras clínicas, las sondas ADN se pueden usar de modo similar a los anticuerpos, como un instrumento sensible y específico para detectar la presencia de virus. Sin embargo, las sondas ADN permiten detectar el virus incluso en ausencia de replicación vírica, el análisis con sondas ADN tiene utilidad especial en las infecciones como los citomegalovirus y los papilomavirus humanos. Las sondas ADN se sintetizan por medios químicos o se obtienen mediante clonación de fragmentos o un genoma vírico completo en vectores bacterianos (plasmados, cósmidos), las copias ADN de virus ARN se preparan con la transcriptasa inversa de retrovirus y después se clonan en vectores, las sondas ADN son marcadas con nucleótidos radiactivos o químicamente modificados (p. ej., uridina biotinilada, bromodeoxiuridina) para permitir su detección y cuantificación.¹

Las sondas ADN permite detectar secuencias genéticas víricas específicas en biopsias tisulares fijas permeabilizadas mediante hibridación *in situ*, los ácidos nucleicos víricos presentes en extractos de muestras clínicas se pueden detectar mediante fijación de un pequeño volumen del extracto en un filtro de nitrocelulosa (dot blot o mancha puntiforme), seguida por hibridación del filtro con ADN vírico específico marcado. Como alternativa, el ADN vírico o los productos digeridos con endonucleasa de restricción del ADN vírico, se pueden separar mediante electroforesis, transferir a un filtro de nitrocelulosa (Southern Blot-hibridación con sonda ADN:ADN). El ARN vírico separado por electroforesis (Northern Blot-hibridación con sonda ARN:ADN), la hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos víricos se detecta mediante técnicas de autorradiografía, fluorescencia o inmunofluorescencia (IAE), por ejemplo, es posible utilizar una sonda ADN marcada con biotina, junto con avidina (una proteína que se une fuertemente a la biotina) marcada con una sustancia fluorescente o una enzima (peroxidasa del rábano picante) para detectar ácidos nucleicos víricos; en el comercio existen muchas sondas víricas y equipos para la

detección de virus, esta metodología es útil para detección y localización de genomas víricos en muestras clínicas, incluso con cantidades significativas de material genético vírico.

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** permite detectar copias únicas de ADN vírico, y es una de las técnicas de análisis genético más nuevas. Se incubaba una muestra con dos oligonucleótidos de ADN cortos, complementarios con los extremos de una secuencia genética conocida del ADN vírico, una ADN polimerasa termoc estable, nucleótidos y tampones; los oligonucleótidos forman híbridos con el ADN vírico y actúan como iniciadores para la polimerasa, que copia un segmento del ADN; la muestra es calentada para desnaturar el ADN (separando las cadenas de la doble hélice) y enfriada para permitir la hibridación de los cebadores con el nuevo ADN, cada copia de ADN se convierte en una nueva plantilla. El proceso se repite muchas veces (20 a 40) para amplificar la secuencia de ADN original de una forma exponencial, se puede obtener en cuestión de horas la amplificación millones de veces de una secuencia diana. Esta técnica tiene utilidad especial para detectar secuencias de virus latentes e integrados, como retrovirus, herpesvirus.¹

La característica fundamental de la PCR es su elevada sensibilidad, en algunos cuadros clínicos asociados a herpesvirus ha llegado a ser el *gold standard* y es aquí donde se encuentran sus aplicaciones más definidas, la sensibilidad puede verse afectada por diversos factores: tipo de iniciadores, el método de extracción y por las sustancias inhibitoras de la Taq polimerasa presentes en la muestra clínica. La extrema sensibilidad es también un arma de doble filo, pues nos puede plantear problemas de interpretación de los resultados, algunos herpesvirus constituyen un ejemplo paradigmático y la especificidad es también muy elevada, dependiendo de la adecuada selección de los iniciadores y del uso de una técnica depurada que evite contaminaciones de amplificadas (*carry over*). Está fuera del ámbito de este protocolo la descripción detallada de los aspectos técnicos que condicionan la calidad de los resultados, remitiendo al lector a manuales específicos.¹⁰

PCR DE VIRUS HERPES SIMPLES

De las diversas aplicaciones de la técnica PCR en las infecciones por el virus de herpes simples (VHS), es el diagnóstico de las encefalitis. Existen en la literatura numerosos protocolos de amplificación del ADN de los VHS, se han utilizado multitud de iniciadores, algunos comunes a los dos tipos, otros específicos de cada virus. La tendencia actual es la de utilizar iniciadores que amplifiquen los dos tipos a la vez y que permitan su detección específica, bien por la longitud del amplificado o tras restricción del mismo con endonucleasas y suelen amplificarse secuencias de los genes de la ADN polimerasa viral, así como de las glucoproteínas B y G.

Como en la meningitis (VHS-2, predominantemente) en algunas ocasiones este último cuadro se asocia con lesiones genitales, pero no siempre y en ambos casos, es posible detectar los VHS en muestra de LCR en estadios iniciales de la enfermedad, lo que permite instaurar una terapéutica precoz que tiene gran importancia en el pronóstico. Por supuesto, pueden detectarse los virus en tejido cerebral, pero la práctica de biopsia con estos fines ha quedado en desuso ante la eficacia del aciclovir.

Aplicaciones de PCR en la detección de VHS.

Infecciones congénitas y neonatales por los VHS, en cuadro que afecta a pie no está indicada la PCR, encefalitis, e infección diseminada, se asocia sobre todo al VHS-2 y, a veces, estos cuadros están superpuestos, no es infrecuente la afectación neurológica del neonato en ausencia de lesiones dérmicas, en LCR es el método de elección porque no suele detectarse genoma en la sangre o suero del paciente.

Debido a su rapidez y su sensibilidad algunos autores han propuesto a la PCR como método confirmatorio excelente, lesiones córneas porque puede fallar el cultivo a causa de la dificultad en obtener la muestra; la PCR parece una opción razonable. Por otra parte, se ha implicado a los VHS en el rechazo de trasplantes de córnea, aunque los estudios no son concluyentes.¹⁰

PCR DE CITOMEGALOVIRUS

Las técnicas de PCR actuales encuentran un obstáculo adicional en el diagnóstico de las infecciones por el CMV: la facilidad con que el virus reactiva y se replica sin dar lugar a enfermedad dificulta su valoración, en general sólo debe aplicarse a casos en los que es necesario disponer de métodos con la máxima sensibilidad, aunque, en teoría puede utilizarse en el diagnóstico de múltiples infecciones por CMV en inmunodeprimidos o inmunocomprometidos, debemos realizar las consideraciones siguientes: infecciones del sistema nervioso central (encefalitis, polirradiculitis, mielitis, etc.) Este tipo de afectación suele aparecer en pacientes con SIDA y la detección de genoma en LCR es el método de elección, se correlaciona con los estudios histopatológicos y con las manifestaciones clínicas, siendo mucho más sensible que el cultivo, a la vez rápido y no invasivo.¹⁰

Aplicaciones de PCR en la detección de CMV.

En infecciones por CMV en pacientes con SIDA (retinitis, esofagitis, duodenitis, colitis, etc.), de ellas, la más frecuente es la retinitis, que suele diagnosticarse por exploración oftalmológica, en algunos casos seleccionados, cabe la necesidad de un diagnóstico diferencial (v.g. con el VVZ) y la confirmación. No debe aplicarse sobre otras muestras, como orina, sangre, etc., que no confirmarían el diagnóstico etiológico de retinitis por CMV, el resto de cuadros se diagnostica por cultivo o *shell vial*, infecciones congénitas y neonatales, puede detectarse ADN de CMV en suero y LCR de neonatos con infección congénita, recientemente se ha descrito que los infectados con detección de genoma en LCR se correlacionan con retraso en el desarrollo neurosensorial, infecciones en trasplantados, la PCR es muy sensible y puede predecir precozmente el riesgo de reactivación, lo que no quiere decir enfermedad, sus aplicaciones quizá en que los trasplantados de médula ósea o pulmonares y con la evolución favorable del tratamiento antiviral, sean los grupos con indicaciones futuras más precisas.¹⁰

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Parte de las infecciones que ocasionan alguna enfermedad en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, como los receptores de órganos, medula ósea, o embarazos de alto riesgo son ocasionadas por virus, dando como resultado rechazo del órgano trasplantado o malformaciones congénitas, por eso es importante realizar métodos confirmatorios para diagnosticar estas infecciones; sin embargo, hospitales como el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, sólo cuenta con pruebas de tamizaje, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA), prueba poco confiable por sus falsos positivos o negativos, es por ello considerable establecer un método confirmatorio, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para evitar el posible rechazo del órgano trasplantado, acortar los días de hospitalización, disminuir costos en la atención del paciente y en ocasiones la muerte. Que permita evaluar y diagnosticar a virus de gran relevancia como son citomegalovirus y herpes simples tipo II, entre otros.

OBJETIVO

Determinar la presencia de los virus herpes simples II (VHS-II) y Citomegalovirus (CMV) por medio del método de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), en muestras positivas para anticuerpos IgG e IgM por el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

HIPÓTESIS

Si las muestras tienen títulos elevados para los anticuerpos IgG y positivas para los anticuerpos IgM en el ensayo inmunoenzimático (ELISA), indica que el virus está activo, por lo tanto el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) será positivo.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes del Centro Medico Nacional 20 de Noviembre que acuden al laboratorio de virología, en un tiempo aproximado de 6 meses.

CRITERIO DE INCLUSIÓN

Las muestras de sueros o plasmas de pacientes inmunocomprometidos, inmunosuprimidos, donadores-receptores de órganos y médula ósea, trasplantados y el seguimiento de aquellos que están comprometidos con algún otro órgano, con títulos elevados de anticuerpos de tipo IgG y positivas para IgM por el método de ELISA.

CRITERIO DE EXCLUSIÓN

No se incluye en este trabajo los sueros o plasmas con varias descongelaciones, e inadecuada identificación de los datos del paciente.

VARIABLE DEPENDIENTE

El número de muestras positivas por el método de ELISA para la realización de PCR en sueros o plasmas de pacientes que acudieron al laboratorio de virología en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

VARIABLE INDEPENDIENTE

El método utilizado para el aislamiento y cantidad obtenida de ADN.

DISEÑO ESTADÍSTICO

Se realizó tablas y gráficos en las que se observa la frecuencia de muestras positivas de los virus herpes simples tipo II y citomegalovirus en PCR, obtenidas en el C.M.N. 20 de Noviembre.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ÁREAS FÍSICAS

Área de trabajo para extracción

Área de trabajo para amplificación y visualización

MATERIAL Y MÉTODOS

Guantes desechables

Gradilla para tubos eppendorf de 1.5 mL

Tubos eppendorf de 1.5 mL

Gasas estériles

Cubrebocas

Recipiente para hielo

Hielo

Puntas para pipeta con filtro 1000 μ L , 100 μ L , 10 μ L.

EQUIPO

Microcentrífuga Mikro 20

Tres pipetas ajustables 1-20 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L Finnipipette-labsystems para el área de extracción.

Tres pipetas ajustables 1-20 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L Finnipipette-labsystems para el área de visualización.

Baño ajustable de 50-56° C

Lector de ELISA para la lectura a 405 nm ELISA Processor II Behring

Vortex

Termociclador Techne

REACTIVOS

EXTRACCIÓN Pharma Gen S.A.

Solución de extracción para muestras líquidas

Solución de dilución

Isopropanol

Etanol al 70%

AMPLIFICACIÓN

Tubos incoloros; para amplificación y visualización de HSV tipo II

Tubos de color; para amplificación y visualización de CMV

VISUALIZACIÓN Pharma Gen S.A.

Oligo específico para HSV II

Oligo específico para CMV

Oligo de control interno

Solución de unión de oligos

Solución de hibridación

Solución de revelado

Diluyente del conjugado

Solución de lavado de placas

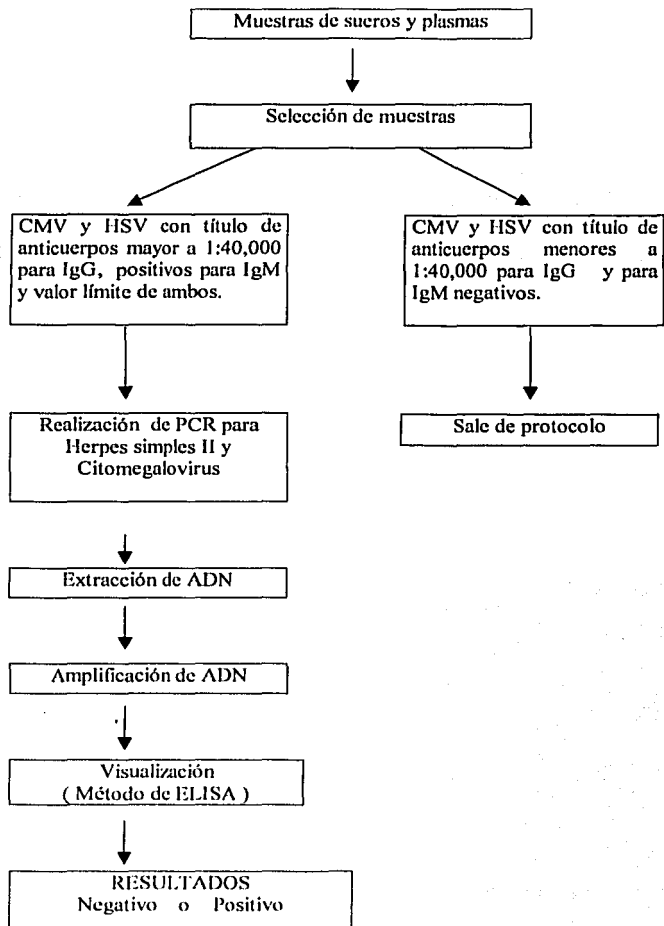
Conjugado

Agua destilada

MATERIAL BIOLÓGICO

Sueros o plasmas

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS

REALIZACIÓN DE PCR DE CITOMEGALOVIRUS (CMV) Y HERPES SIMPLE TIPO II (HSV-II)

1 CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 1.1 Extraer el plasma o suero de las muestras sanguíneas.
- 1.2 Se separa una alícuota aproximadamente de 500 µL de muestra a un tubo de vidrio, identificando con nombre del paciente y número progresivo.
- 1.3 Conservadas a -70° C.
- 1.4 Se seleccionaron las muestras a procesar: CMV y HSV con título de anticuerpos positivos para IgG e IgM y valor límite de ambos.

NOTA: En la práctica, deben evaluarse varios aspectos en la selección de un método para la extracción: tipo de muestra (como sangre total, orina, heces, etc., ya que deben ser sometidas a procesos muy agresivos), además la cantidad disponible, la sensibilidad que se desea alcanzar, la toxicidad de los reactivos, el tiempo que dura el proceso de extracción y los equipos para cada procedimiento.

Cuando se emplea como muestra suero o plasma, se obtienen los mismos resultados en comparación con sangre total, presentando otra ventaja que es, requerir menos tiempo para la extracción del ADN ya que no hay células que interfieran en este proceso.¹⁸

2 EXTRACCIÓN DE ADN

- 2.1 Se descongelan las muestras seleccionadas a temperatura ambiente.
- 2.2 Se identificaron tubos de eppendorf de 1.5 mL con número consecutivo de la muestra e iniciales del paciente, así como el control positivo y negativo para cada uno de los virus, posteriormente se colocaron en una gradilla.
- 2.3 Se determinó la cantidad de reactivo a utilizar de **solución de extracción para muestras líquidas**, un tubo de eppendorf es para cada 5 muestras.
- 2.4 Se descongelaron los tubos eppendorf de **solución de extracción para muestras líquidas** en baño maría en un tiempo aproximado de 10 segundos.

- 2.5 Se colocaron 200 μL de **solución de extracción de muestras líquidas** a cada tubo eppendorf identificado de pacientes y controles.
- 2.6 De la muestra suero o plasma del paciente se agregó 50 μL al tubo correspondiente.
- 2.7 De la **solución de dilución** se adicionó 50 μL a los controles negativos de CMV y HSV tipo II.
- 2.8 Agitando 2-3 segundos en vórtex.
- 2.9 Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- 2.10 Añadiendo 250 μL de **Isopropanol** a cada tubo, incluyendo el control negativo, mezclando 2-3 segundos en vórtex.
- 2.11 Se realizó la centrifugación en la microcentrífuga a 13000 r.p.m durante 10 minutos.
- 2.12 Se decantó el sobrenadante con cuidado, el resto del líquido se retira con micropipeta cuidando de no llevarse el precipitado.
- 2.13 Se añadió 500 μL de **Etanol al 70%** y se invierten los tubos varias veces.
- 2.14 Se repiten los pasos 2.11 y 2.12 en ese orden.
- 2.15 De la solución de dilución se agregó 25 μL a cada tubo, resuspendiendo de 10-15 veces con la micropipeta, se tomaron 5 μL de **solución de ADN extraído** de las muestras, para la reacción de amplificación y el resto se guardó a -70°C .

3 AMPLIFICACIÓN

- 3.1 Se descongelaron el número de Tubos de amplificación necesarios, incubando durante unos segundos a 37°C en baño maría. Una vez descongelados se colocan en hielo, considerando los tubos de controles los 2 positivos y los 2 negativos.
- 3.2 Al mismo tiempo se eligieron los tubos porque en PCR son de dos tipos:
Tubos incoloros: son para la amplificación y visualización de HSV (tipo II).
Tubos de color: son para la amplificación y visualización de CMV.
En caso de la detección de los dos virus se descongelan dos tubos por muestra. uno incoloro y otro de color.
- 3.3 Se identificaron los tubos con el número correspondiente de la muestra.
- 3.4 A cada tubo se agregó 5 μL de la **solución de ADN extraído** de la muestra, teniendo un control negativo que sirvió como negativo en la amplificación (también será

blanco de visualización). Si se detecta al mismo tiempo a los virus CMV y HSV, para control negativo se realizó tanto un tubo incoloro como a un tubo de color, puesto que cada virus ha de tener su control negativo.

- 3.5 Se programó el termociclador en los siguientes ciclos de temperatura (el programa es el mismo para los dos tipos de tubos de amplificación, los incoloros y los de color)

1 ciclo:	94° C	4 minutos.
40 ciclos:	94° C	30 segundos.
	56° C	1 minuto.
	72° C	1 minuto.
1 ciclo:	72° C	10 minutos.
	4° C continuo hasta recoger los tubos.	

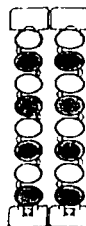
- 3.6 Ejecutando el programa anterior. Los tubos de Amplificación se colocan en el termociclador cuando el bloque alcanzó los 94° C.
- 3.7 La duración de la amplificación es de unas 4 horas.
- 3.8 Una vez concluida la amplificación, los tubos se guardan a 4° C hasta el análisis de visualización, ya sea en el termociclador o en refrigeración.

4 VISUALIZACIÓN

- 4.1 Se preparó la **Solución de Lavado** con 200 mL de Tampón de lavado en 800 mL de agua destilada y homogenizar invirtiendo varias veces.
- 4.2 Sacar de refrigeración las tiras necesarias de la placa por muestra a analizar. Para la detección, se calculó el número de pocillos necesarios, multiplicando el número de muestras por el número de virus a detectar más el control interno de cada uno de ellos. En cada tubo de PCR tanto incoloro como de color hay que visualizar su control interno.

COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS

CONTROL NEGATIVO
CONTROL INTERNO DEL NEGATIVO
CONTROL POSITIVO
CONTROL INTERNO DEL POSITIVO
MUESTRA 1
CONTROL INTERNO DE MUESTRA 1
MUESTRA 2
CONTROL INTERNO DE MUESTRA 2



- 4.3 Se preparó la cantidad adecuada al número de muestras a procesar de la **solución de oligos** para cada uno de los virus. Para ello, se diluyó 10 μL de **Oligo específico** en 90 μL de **solución de unión de oligos** por cada muestra a analizar, considerando al control positivo y el negativo, este mismo proceso se realizó para el **Oligo de Control Interno**. En este caso del control interno, los dos tipos de tubos de amplificación se visualizan con la misma sonda, en pocillos separados, para cada uno de los virus.
- 4.4 Se añadió a cada pocillo de la tira 100 μL de uno de los tubos de **solución de oligo**, los controles positivo y negativo incluyendo el oligo de control interno. Es aconsejable mantener siempre el mismo orden de oligos en los pocillos, para evitar errores y facilitar la lectura.
- 4.5 Se tapó la placa con cinta adhesiva e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4.6 Mientras tanto, colocar las muestras amplificadas en el termociclador e incubar a 100° C durante 10 minutos. Programa que incluye el termociclador de 15 minutos para que una vez transcurridos los 10 minutos las muestras sigan a 100° C.
- 4.7 Se pasó inmediatamente los tubos a un recipiente con hielo. Enfriar durante 5 minutos, obteniéndose las muestras desnaturalizadas.
- 4.8 Concluido el tiempo de la incubación de la placa, se lavaron los pocillos con solución de tampón de lavado, con micropipeta. En el lavado se llenan los pocillos

hasta el borde, vaciarlos sacudiendo la placa sobre un recipiente o tarja y secar golpeando en papel absorbente. Después del último lavado, secar totalmente los pocillos golpeando la placa invertida sobre un papel absorbente limpio. Repetir este proceso tres veces.

- 4.9 Se añadió 100 μL de **Solución de Hibridación** a cada pocillo para ambos virus.
- 4.10 La muestra desnaturalizada se añadieron 10 μL a cada uno de los pocillos de los virus que se quiere detectar.
- 4.11 Se tapó la placa con cinta adhesiva e incubó a 50° C durante una hora.
- 4.12 Se lavan los pocillos como en el punto 4.8.
- 4.13 La **solución de conjugado** se preparó, mezclando en un tubo 100 μL de **Diluyente de Conjugado** y 0.2 μL de **Conjugado** por pocillo a analizar. La mezcla se prepara según el número de pocillos a utilizar con excedente del 10%.
- 4.14 Se añadió 100 μL de **solución diluida de Conjugado** a cada pocillo.
- 4.15 Se tapó la placa con cinta adhesiva e incubó a temperatura ambiente (25° C) durante 1 hora.
- 4.16 Se lavan los pocillos como en el punto 4.8.
- 4.17 Se añadió 100 μL de **Solución de Revelado** a cada pocillo.
- 4.18 Se tapó la placa con cinta adhesiva e incubaron a temperatura ambiente (25° C) durante 1 hora.
- 4.19 Se realizó la lectura de las placas en lector de ELISA Beep II (Bering) a 405 nm de referencia.
- 4.20 Obtención de absorbancias
- 4.21 Obtención de resultados positivo y negativo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ABSORBANCIA

	MUESTRA	CONTROL INTERNO
POSITIVO	> a 0.35	> a 0.4
NEGATIVO	< a 0.35	> a 0.4
INHIBIDA	< a 0.35	< a 0.4
CONTAMINADA	cuando el control negativo sea mayor de 0.25	

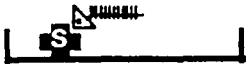
Área física.- áreas de trabajo físicamente separadas para cada fase, de extracción, amplificación y visualización, mínimo deben ser dos, para que no haya contacto posible entre las muestras durante todo el procedimiento. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo identificado y nunca deberán de salir de cada una de ellas

Área de extracción: en esta área se hace la preparación de las muestras y la extracción del ADN.

Área de amplificación y visualización: en esta área se lleva a cabo la amplificación y la visualización del producto amplificado. El material de esta área nunca ha de entrar en contacto con el área de extracción. Evitar ir al área de extracción después de haber estado trabajando en el área de visualización.

DETECCIÓN EN PLACA DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

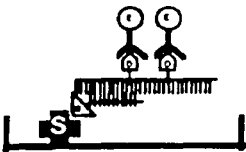
1. UNIÓN SONDA AL POCILLO



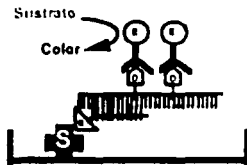
2. HIBRIDACIÓN



3. INMUNODETECCIÓN



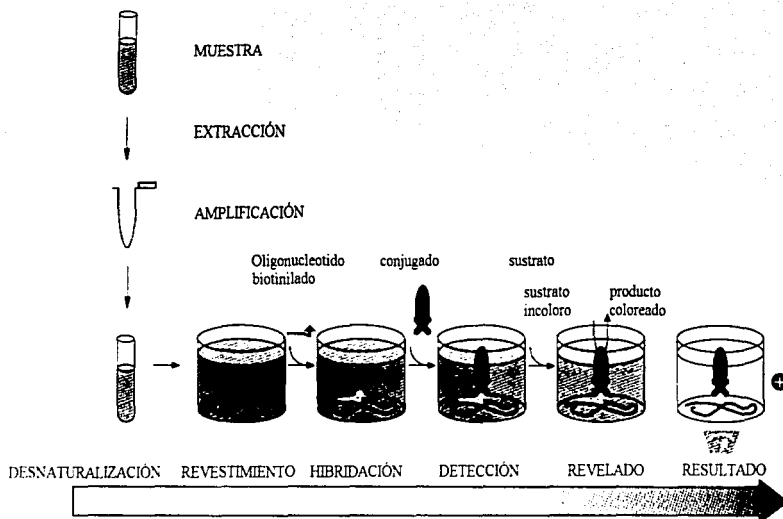
4. REVELADO



Detección en placa. 1. La sonda, marcada con biotina (B), se une a la estreptavidina (S) que tapiza el fondo de los pocillos de la placa. 2. A continuación el producto amplificado marcado con dUTP-Digoxigenina (D), hibrida específicamente con la sonda. 3. Un anticuerpo antidigoxigenina, unido a peroxidasa (E), se une a las moléculas de digoxigenina del producto amplificado. 4. El revelado se lleva a cabo con un sustrato cromogénico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIG. 4. MÉTODO EXPERIMENTAL



TESIS CON

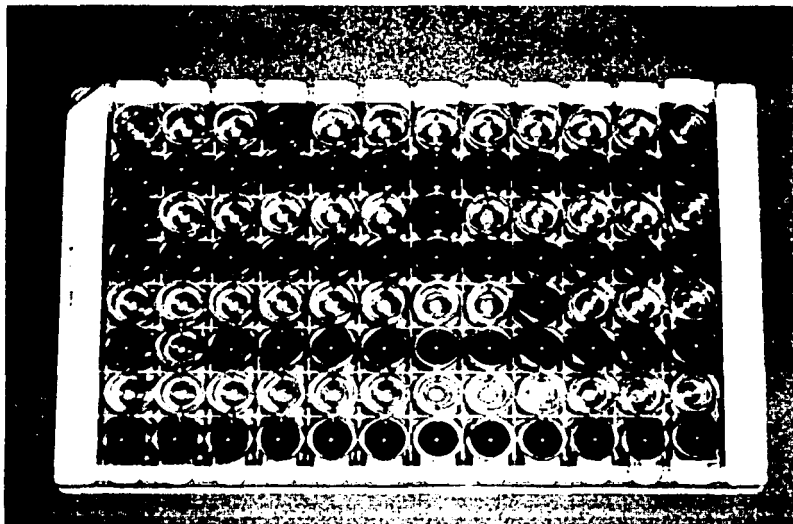


FIG. 5. Método de PCR para la detección de HSV-II y CMV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Se analizaron 125 muestras de sueros y plasmas de pacientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre I.S.S.S.T.E.

**CUADRO I.I. NÚMERO DE MUESTRAS PARA CITOMEGALOVIRUS (CMV)
POR SERVICIO MÉDICO.**

SERVICIOS MÉDICOS	No. DE MUESTRAS
Medicina Interna Pediatría (MIP)	3
Nefrología	13
Unidad de trasplante (UTR)	44
Gastroenterología	4
Inmunología	9
Medicina interna (MI)	13
Admisión Continua Pediatría (ACP)	1
Unidad de Terapia Intensiva Pediatría (UTIP)	7
Reumatología	1
Consulta Externa (CE)	11
Infectología Pediátrica	3
Neumología	2
Hematología	3
Cardiología	2
Neurología Pediátrica (NP)	2
Cirugía General	5
Perinatología	1
CP/CG	1
Total	125

CUADRO 1.2. NÚMERO DE MUESTRAS PARA HERPES SIMPLES TIPO II (HSV-II) POR SERVICIO MÉDICO

SERVICIOS MÉDICOS	No. DE MUESTRAS
Infectología	1
Neurología	2
Nefrología	8
Unidad de Trasplante (UTR)	27
Gastroenterología	4
Inmunología	22
Hemodiálisis	1
Medicina Interna (MI)	12
ACP	2
Reumatología	1
Consulta Externa (CE)	12
Biología de la Reproducción Humana (BRH)	7
Neumología	2
Otorrinolaringología	2
Cardiología	1
Neurología Pediátrica	4
Cirugía General	8
Perinatología	2
Foniatría	1
Ortopedia	1
Endocrinología	1
Ginecología	2
Alergias	1
Genética	1
TOTAL	125

Las muestras que contienen ambos cuadros, se obtuvieron en un intervalo de 6 meses aproximadamente con los resultados de la determinación serológica, lo cual nos permitió su clasificación.

TABLA 1. DATOS DE MUESTRAS CON ANTICUERPOS IgG E IgM DE ELISA Y POSITIVAS EN PCR PARA CMV

IgG V.L	3 3	0	4	7 3
≤ 10,000	16 6	4	2	22 6
≤ 40,000	17 3	15 2	14	46 5
> 40,000	27	12	11	50
IgG IgM	+	V. L	-	
	63 12	31 2	31	125 14

*VALOR DE CORTE = 0.2

*VALOR LÍMITE (V. L) = 0.2 < D.O > 0.1

* MUESTRAS POSITIVAS A PCR

TABLA 2. DATOS DE MUESTRAS DE ANTICUERPOS IgG E IgM EN ELISA PARA HSV-II

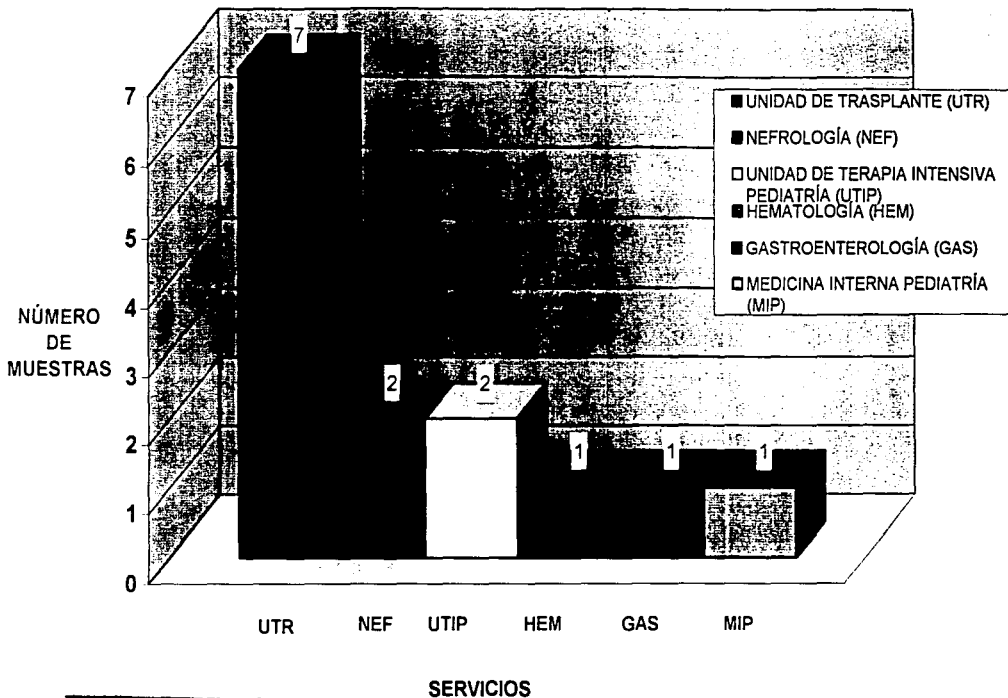
IgG V.L	0	3	9	12
≤ 20,000	5	17	1	23
≤ 50,000	7	15	43	65
> 50,000	10	3	12	25
IgM	+	V.L	-	
	22	38	65	125

* VALOR DE CORTE = 0.2

* VALOR LIMITE (V. L) = 0.2 <D.O> 0.1

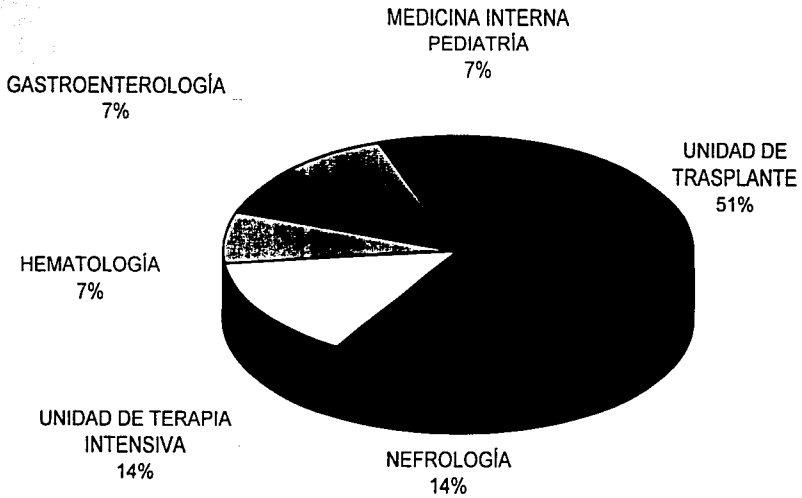
En la Tabla 1 y 2 se muestra la integración de los resultados obtenidos de la determinación de anticuerpos IgG e IgM por el método de ELISA, con los resultados de PCR, posteriormente se representan gráficas de las muestras positivas obtenidas por este método, por número de muestras, servicio médico y la frecuencia en porcentajes.

GRÁFICA 1. MUESTRAS POSITIVAS EN PCR DE CMV



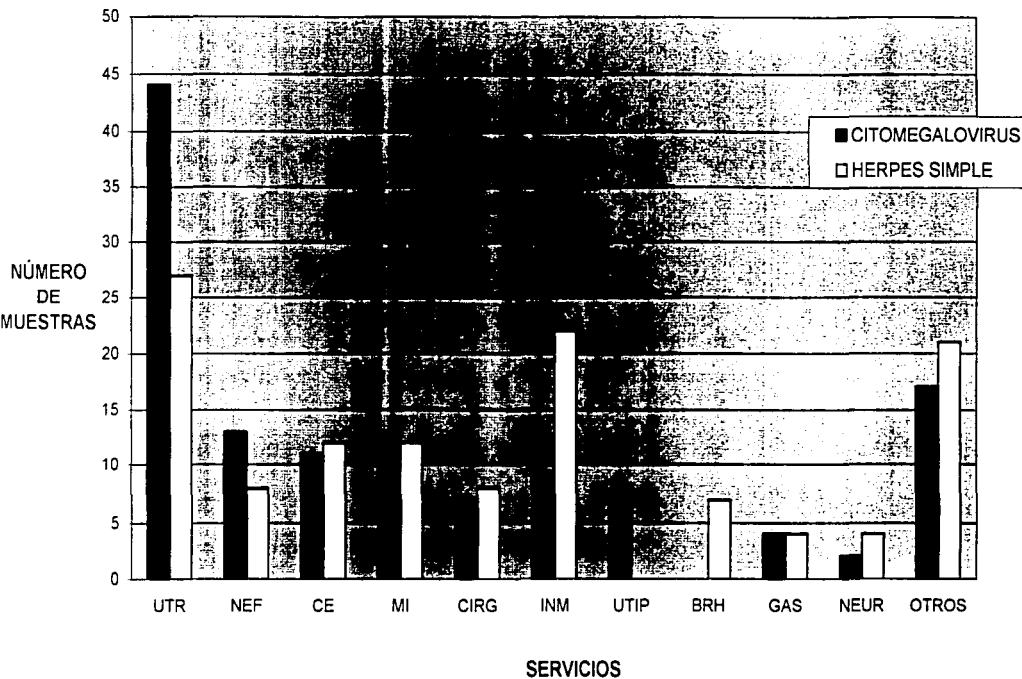
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 2. MUESTRAS POSITIVAS DE CMV POR PCR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 3. FRECUENCIA DE MUESTRAS EN DIFERENTES SERVICIOS PARA CITOMEGALOVIRUS Y HERPES SIMPLE



NOTA: OTROS INCLUYE A LOS SIGUIENTES SERVICIOS: INFECTOLOGÍA, MEDICINA INTERNA PEDIATRÍA, REUMATOLOGÍA, INFECTO-PEDIATRÍA, NEUMOLOGÍA, HEMATOLOGÍA, CARDIOLOGÍA, PERINATOLOGÍA, FONIATRÍA, ORTOPEDIA, ENDOCRINOLOGÍA, GINECOLOGÍA, ALERGIA, GENÉTICA.

CUADRO 3. NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS PARA CMV POR DIAGNÓSTICO

No. DE MUESTRAS	DIAGNÓSTICO
6	Rechazo del Trasplante
2	Insuficiencia Renal Crónica
3	Neonatos
1	Donador de Médula Ósea
1	Gastroenterología
1	Control del Trasplante
<hr/> 14	

Se observa la relación de las muestras positivas con el diagnóstico, esto ayuda de manera importante, porque se puede relacionar la historia clínica, los síntomas del paciente y los estudios de laboratorio, para identificar el agente causal en este caso tipo viral. Obteniendo 6 muestras con un diagnóstico de rechazo de trasplante causado por Citomegalovirus, 2 de insuficiencia renal crónica, que posiblemente sea necesario ingresar a protocolo de trasplante por las complicaciones de la enfermedad, otra de las enfermedades como ya se mencionó son las malformaciones congénitas, esto se refleja por las tres muestras provenientes de neonatos en los que se quiere conocer si el agente causal es un virus. es importante realizar PCR principalmente en donadores definitivos y receptores, de tal forma que pueda obtenerse la información necesaria y suficiente para realizar el trasplante, como se puede observar del donador de médula ósea y del control de trasplante, para reducir la fuente menor posible de infección que pueda contaminar los órganos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De 125 muestras (tabla 1) analizadas por el método de ELISA para CMV, 63 fueron positivas con una lectura mayor ó igual a 0.200 de absorbancia para IgM; 31 muestras se encontraron en un valor límite con una lectura de 0.100 a 0.200 y 31 muestras se encontraron con un valor menor ó igual a 0.100 por lo que se consideraron negativas.

Estas mismas muestras se analizaron por el método de PCR obteniendo los resultados que se muestran en la misma tabla con color rojo, de las 63 muestras positivas, sólo 12 se confirmaron y de las 31 en valor límite sólo 2, siendo un total de 14 muestras positivas y 111 negativas por este método. Es muy evidente la sensibilidad de la técnica de PCR en comparación con ELISA ya que de las 94 muestras inicialmente consideradas como positivas, sólo 14 realmente lo eran conteniendo actividad viral, y el resto fueron diagnosticadas incorrectamente como una infección reciente causada por CMV, dándose innecesariamente tratamiento antiviral ocasionando costos elevados; afectando la actividad inmunológica sobre todo en pacientes inmunocomprometidos como los trasplantados.

Las muestras incluidas en este estudio provienen de diferentes servicios del hospital como lo muestran las gráficas 1 y 2 en las que se observa 7 muestras positivas de la Unidad de Trasplante (UTR) correspondiendo el 50% de un total de muestras positivas, siendo la mayor incidencia en este servicio, indicando que estos pacientes son los más susceptibles a contraer infecciones, por el tratamiento inmunosupresor necesario para evitar el rechazo del órgano trasplantado y las 7 restantes corresponden a los siguientes servicios: 2 de Unidad de Terapia Intensiva Pediatría (UTIP), 2 de Nefrología, 1 de Hematología, 1 de gastroenterología y 1 de Medicina Interna pediatría (MIP).

Con respecto a la determinación de IgG se consideran positivas aquellas muestras que presentaron títulos mayor ó igual a 40,000 por el método de ELISA y que además fueron positivas ó se encontraron en valor límite para IgM. En la tabla 1. podemos observar que 32 muestras cumplen este criterio, sin embargo al confirmar estos resultados por el método de PCR se encontró que únicamente 5 de ellas fueron positivas. El determinar IgG para este esquema no es muy útil ya que esta inmunoglobulina es de memoria por lo que encontrar títulos elevados representa un contacto previo con el virus.

Como se observa en el cuadro 3 la relación de muestras positivas con el diagnóstico es importante para orientar los estudios de laboratorio a realizar como por ejemplo el cultivo, aunque en el caso de los virus de lento crecimiento podría ser inadecuado por el tiempo que estos requieren, además se cuenta con la serología, pero no es suficiente para asegurar la actividad viral como se menciona anteriormente. En este cuadro se obtuvo 6 muestras con diagnóstico de rechazo de trasplante causado por citomegalovirus, 2 de insuficiencia renal crónica, que posiblemente sea necesario ingresar a protocolo de trasplante por las complicaciones de la enfermedad, por lo que es importante la realización de PCR principalmente en donadores definitivos y receptores, de tal forma que pueda obtenerse la información necesaria y suficiente para realizar el trasplante, y reducir el riesgo de que adquieran una infección que pueda contaminar los órganos, otra de las enfermedades son las malformaciones congénitas, esto se refleja por las tres muestras provenientes de neonatos en los que quiere conocer si el agente causal es un virus.

Con respecto a herpes simple tipo II, se observa (tabla 2) que no hubo muestras positivas por PCR, para IgG ni para IgM, sin embargo estos resultados se deben tomar con reserva ya que en este método solamente se utilizó Herpes simple tipo II y el método de ELISA esta diseñado para Herpes simple total es decir que incluye el tipo I y el II, por lo que no podemos considerar que las muestras negativas lo sean en realidad, pues existe la posibilidad de que sean positivas para el tipo I.

Posteriormente se agrupan las 125 muestras para Citomegalovirus y Herpes simple tipo II, por el número de muestras obtenidas de cada servicio médico, y conocer la frecuencia con la que se presentan estos virus, observamos que en la Unidad de Trasplante se encuentra en mayor número de muestras para CMV en comparación con los otros servicios, probablemente se deba a que el virus se puede transmitir fácilmente a la mayor población y que el sistema inmune de una persona sana no permite que se desarrolle la enfermedad, no así en los pacientes de Unidad de Trasplante (UTR), cuyo sistema inmune esta inmunodeprimido. Con respecto a Herpes simple la mayor frecuencia se encuentra en UTR e Inmunología sin embargo no hay gran diferencia entre este valor y la menor frecuencia, esto posiblemente se debe a que el virus provoca una enfermedad muy frecuente en la población y poco agresiva, que generalmente no requiere de un tratamiento médico.

Este método permite a partir de cantidades mínimas de material genómico viral, proporcionando gran sensibilidad, llevando un control de calidad, por la presencia de un control interno en la amplificación, Este control interno se amplifica del mismo modo que las muestras, para cerciorarse que los reactivos utilizados durante este paso se encuentra sin contaminantes y en buenas condiciones, además este control se introduce en la visualización para distinguir entre aquellas muestras negativas y cuando son inhibidas (posiblemente por degradación del ADN de las muestras), además contiene un blanco que se da el mismo tratamiento durante la extracción del ADN de las muestras, posteriormente en la visualización se introduce como control negativo, cuenta con control positivo que indica que la extracción se llevó a cabo satisfactoriamente y que los reactivos utilizados están en buenas condiciones y no contaminados.

Por lo que se considera que en la virología clínica, la utilidad de PCR puede ser muy grande, sobre todo cuando es importante, el diagnóstico antes de que aparezcan síntomas clínicos, obtener información que permita predecir cual será el candidato más idóneo para que el trasplante sea más eficiente y seguro, o para el rastreo epidemiológico de casos, así como la efectividad en el tratamiento antiviral.

CONCLUSIONES

- ★ De 125 muestras obtenidas a través de ELISA para CMV como para HSV se obtuvo un 11% de resultados positivos de CMV.
- ★ Para CMV, los resultados sugieren que la determinación de los títulos de anticuerpos IgG e IgM por el método de ELISA no son suficientes para determinar la existencia de una infección viral activa y debe recurrirse a métodos más sensibles como el método de PCR.
- ★ El método de ELISA utilizado en este estudio para Herpes no distingue de entre Herpes Simple tipo I y Herpes Simple tipo II.
- ★ Para HSV debemos realizar estudios adicionales que incluyan métodos de ELISA específicas para anticuerpos contra el virus del Herpes Simple tipo I y tipo II, como una prueba de tamizaje y poder correlacionar con el método de PCR para ambos virus I y II.
- ★ Con base en el estudio realizado, podemos considerar que la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una herramienta útil e importante para la orientación en el manejo del paciente con infección activa viral, permitiendo un diagnóstico más acertado y la optimización de recursos terapéuticos.
- ★ Como se ha demostrado la PCR es más sensible en comparación con el método de ELISA, observándose un valor positivo en pacientes que no muestran cuadros clínicos.

PROPUESTAS

- ♣ Determinar anticuerpos IgG e IgM por el método serológico de ELISA de Herpes Simple-I y Herpes Simple-II, además de realizar PCR para conocer los resultados para ambos virus, de los dos métodos.
- ♣ Ampliar la determinación de otros virus por ejemplo a EBV por PCR, ya que es un método molecular para detectar a tiempo las infecciones, y que cada vez se está utilizando en forma rutinaria, con alta especificidad.
- ♣ Continuar el estudio de Herpes Simple-I y II, aunque no se hayan obtenidos resultados positivos para PCR, para estudiar a la población de este hospital, porque se asocia al rechazo de trasplantes de órganos.

REFERENCIAS

1. Murray R P. Microbiología Médica. 2ª. ed. España: Ed. Harcourt Brace, 1999:571-597.
2. Villegas J, Rosado A. Citomegalovirus. Reencuentro con un antiguo conocido. Ciencia, 1988; 39: 85-101.
3. Lupromise J. Virología. 2ª. ed. España: Ed. Panamericana, 1980: 1-10.
4. Mandell G L. Enfermedades infecciosas. 4ª. ed. México: Ed. Panamericana, 1998 : 16-23
5. Sherris C J. Microbiología Médica. Introducción a las enfermedades infecciosas. España: Ed. Doyma, 1993: 631-649.
6. Jawetz E. Manual de Microbiología Médica. 9ª. ed. México: Ed. El Manual Moderno, 1981: 474-483.
7. Kumate J. Manual de Infectología. 11ª. ed. México: S.S.A, 1987:332
8. Riley H D. Reseña de la historia, el descubrimiento, los síntomas, los métodos de diagnóstico, el tratamiento y la profilaxis de la infección por citomegalovirus. Southern Medical Journal, 1997; 90(2):184-190.
9. Kumate J. Manual de técnicas de laboratorio. Diagnóstico Viroológico. 1ª. ed. México: INIDRE, 1993: 27-108.
10. Pérez S J L, Oña N M. Diagnóstico de Laboratorio de las Infecciones por herpesvirus. Facultad de Medicina, 1995; 13: 1-12.

11. Kingsburry D T, Wagner G E. Manual de Microbiología Médica. 1ª. ed. México: Ed Limusa, 1991; 275-283.
12. Acton D J. Virología. México: Ed. Interamericana, 1977: 6-45.
13. Torres P J. Manejo Profiláctico de la Infección por Citomegalovirus en Trasplante Renal. Nefrología Mexicana, 1996; 17(1): 5-7.
14. Resik S, Enamorado A. Prevalencia de anticuerpos contra virus herpes simple, virus Epstein -Barr y citomegalovirus en un grupo de pacientes con hemodiálisis realizada. Revista Cubana de Medicina Tropical, 1999; 51(3):172-6.
15. Ferreira G A, Fisher A R. Clinical utility of a quantitative polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. Transplantation, 1999; 68(7):991-996.
16. Mas V, Alvarellos T. Utility of cytomegalovirus viral load in renal transplant patients in Argentina. Transplantation, 1999; 67(7):1050-1055.
17. Mercado A, Gamba G. Biología molecular en medicina. Hibridación molecular. Revista de Investigación Clínica, 1997; 49(1):75-8
18. Gimeno C, López P J. Diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central por virus herpes simples. Servicios de Microbiología, 2001; 1-4
19. Bobadilla A N, Gamba G. Biología molecular en medicina. Reacción en Cadena de la polimerasa. Revista de Investigación Clínica, 1996; 48(5):401-6.
20. Herrera P J, Gamba G. Biología molecular en medicina. La PCR en la práctica clínica. Revista de investigación Clínica, 1996; 48(6):479-482.

21. Panduro A. Biología molecular en la clínica. México: Ed McGraw-Hill Interamericana, 2000:3-67.
22. Tenorio A, Echeverría E J. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 1993; 44:261-269.
23. De la Vega A H, Alvarado M A. Reacción en cadena de la polimerasa *in situ*. Nuevo método para el diagnóstico genético. *Gaceta Médica de México*, 1998; 134(6):749-751.
24. Cordero S A, Preciado S I. Utilidad de la reacción en cadena con polimerasa (PCR) en la investigación y el diagnóstico en pediatría. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 1993; 50(2):73-78.
25. Margni R. *Inmunología e inmunológica*. 3ª. ed. Buenos Aires – Argentina: Ed. Panamericana, 1989:571-576.
26. Espejo R. *Trasplante. Microbiología del Trasplante*, 2000;1: 1-10.
27. Torres P J. Manejo del paciente con insuficiencia renal crónica en el I.S.S.S.T.E. Criterio de inclusión y exclusión para el programa de trasplante. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. CMN 20 de Noviembre*, 1998;3(4):20-2.
28. Arias C J M. Estudio de receptores de trasplante renal en el período de 1996 a Agosto de 1998. *Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 1998;3(4):23-5.
29. López G L. Estudio de donadores de Trasplante renal en el C.M.N. 20 de Noviembre. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 1998;3(4):26-8.

30. Villegas G J, López S J. Citomegalovirus: alteraciones y deformaciones congénitas, hipótesis patogénica. *Revista Mexicana de Pediatría*, 1986;53:195-211.
31. Villegas G J, Villegas S R. Enterocolitis ulcerativa por virus citomegálico como causa de diarrea prolongada. *Gaceta Médica de México*, 1983;119:455-460.
32. Villegas G J, Villegas S R. Patogenia de las enfermedades causadas por citomegalovirus. *Gaceta Médica de México*, 1984; 120:85-89.
33. Gutiérrez J, Maroto C M. A comparison of two ELISA methods for the investigation of anti-cytomegalovirus IgG antibodies. *Microbios*, 1997; 90:151-4.
34. Landgraf A, Reckmann B. Direct Analysis of polymerase Chain Reaction Products Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Techniques. *Analytical Biochemistry*, 1991; 198:86-91.
35. Adler, S P. Transfusion-associated cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis*, 1983; 5:977-993.