



11234

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
(UNAM)**

**FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA  
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”**

**“USO DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA  
DETECCIÓN DEL HERPES SIMPLES VIRUS-1 EN PACIENTES  
CON QUERATITIS HERPÉTICA”**

**TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN  
OFTALMOLOGÍA**

**QUE PRESENTA  
DRA. ALEJANDRA SÁNCHEZ –NAVARRO PALAZUELOS**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. RAÚL SUÁREZ SÁNCHEZ**



**MÉXICO 2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Dr. Enrique Graue Wiechers**  
**Profesor Titular del Curso**



SUBDIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
U.N.A.M.



**Dr. Raúl Suárez Sánchez**  
**Director de Tesis**



**INSTITUTO DE  
OFTALMOLOGIA**  
FUNDACION CONDE DE VALENCIANA  
JEFATURA DE ENSEÑANZA  
Chimalpopoca 14 México 8, D. F.  
Cal. Obrera



**Dra. Claudia Murillo Correa**  
**Jefa de Enseñanza**

## AGRADECIMIENTOS

### INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA:

- LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR
- RESIDENTES DEL INSTITUTO
- DEPARTAMENTO DE CÓRNEA Y BANCO DE OJOS
  - √ *Dr. Raúl Suárez Sánchez*
  - √ *Dr. Enrique Graue Wiechers*
  - √ *Dra. Concepción Santacruz*
  - √ *Dr. Juan Carlos Cancino*
  - √ *Dr. Rubén López Revilla*
  - √ *Dr. Benjamín Méndez Noble*
  - √ *Dr. Miguel Ángel Reyes López*

## ÍNDICE

RESUMEN	.....p.5
ABSTRACT	.....p.6
INTRODUCCIÓN	.....p.7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	.....p.8
JUSTIFICACIÓN	.....p. 9
HIPÓTESIS	.....p. 9
OBJETIVOS	.....p.9
MATERIAL Y MÉTODOS	.....p.10
RESULTADOS	.....p.12
DISCUSIÓN	.....p.13
CONCLUSIONES	.....p.13
BIBLIOGRAFÍA	..... p.15
FIGURAS	.....p.17

## RESUMEN

**Objetivo:** Detectar el genoma y antígenos del HSV-1 en muestras oculares de pacientes con queratitis herpética.

**Método:** Se analizaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR-genoma) y ELISA (HERPCHEK para antígenos de cápside), las muestras de lágrima y raspado corneal de pacientes con diagnóstico clínico de queratitis herpética epitelial o estromal.

**Resultados:** Se incluyeron 41 pacientes con diagnóstico de enfermedad herpética ocular y 5 controles sanos. Se detectó la presencia de antígenos y genoma del HSV en el 100% de los casos con diagnóstico clínico de queratitis herpética epitelial (9 pacientes), en las estromales (20 pacientes) no se detectó el DNA, a excepción de un caso de estromal necrotizante en donde la lágrima y el raspado presentaron sólo el genoma. 12 pacientes se clasificaron como queratitis herpéticas dudosas, de éstos, 10 presentaban datos de actividad inflamatoria y sólo en el 40% se detectó el genoma y antígenos del HSV.

**Conclusiones:** En casos de sospecha clínica de queratitis herpética epitelial con datos de actividad inflamatoria sugerimos confirmar la presencia del HSV-1 mediante PCR, debido a que su sensibilidad es mayor que el ELISA (HERPCHECK) y sobre todo es más práctica para realizarla en un medio hospitalario. Sugerimos realizar una correlación entre los resultados encontrados por ELISA y PCR con el posible estado de replicación del virus como guía para el tratamiento. En queratitis estromal sin datos de actividad no se detecta el genoma o antígenos del virus en el frotis corneal.

**Palabras clave:** *Queratitis herpética epitelial, Queratitis herpética estromal, Reacción en cadena de la polimerasa y HERPCHEK.*

## ABSTRACT

**Objective:** To detect the genome and HSV-1 antigens in ocular samples of patients with herpetic Keratitis

**Materials and Methods:** We analyzed by polymerase chain reaction (PCR-genome) and ELISA (HERPCHEK to detect capsid antibodies) tear and corneal samples from patients with epithelial or stromal herpetic keratitis.

**Results:** We included 41 patients with the presuntive diagnosis of ocular herpetic disease and 5 controls without herpes. We detected the presence of genome and antigens of HSV in 100% of cases with epithelial keratitis (9 patients), there was a complete absence of HSV genome and antigens in all samples of stromal keratitis, except in one case with the diagnosis of Necrotizing stromal keratitis we found the genome. 12 patients were classified as doubtful herpetic Keratitis and we detected the HSV in 40% of cases with active inflammation.

**Conclusions:** In epithelial herpetic keratitis, we suggest that the presence of Herpes Simplex-1 be confirmed with PCR, given the superior sensitivity and practical approach when compared to the antigenic immunologic reaction. Also correlate the results of the PCR and ELISA with the replicative state of the virus. In the inactive stromal keratitis cases, neither the viral genome nor the antigens against the virus were detected.

**Key Words:** Epithelial herpetic keratitis, Stromal Herpetic Keratitis, PCR and HERPCHEK

## INTRODUCCIÓN

Hay varias razones para estudiar el virus del herpes simple tipo 1 o HSV-1, sus propiedades biológicas, su capacidad para causar una variedad de infecciones, permanecer latente en sus hospederos de por vida y ser reactivado para causar lesiones en el mismo sitio o cerca de la infección inicial (1,2). El HSV-1 pertenece a la familia Herpesviridae, su genoma consta de 152 kb, codifica 72 genes y 70 proteínas.

Los humanos son el único hospedero y reservorio natural del virus. El primer contacto ocurre entre los 6 meses y los 5 años de edad y es subclínico en el 90% de los casos. (3,4,5) Liesegang y colaboradores, reportaron en el estudio comunitario del herpes simple ocular realizado en Minnesota, EUA, que el primer cuadro de herpes ocular aparece en promedio en la tercera década de la vida y menos del 50% presenta antecedentes patológicos de enfermedad ocular herpética previa. (6,7,8,9)

En los casos recurrentes, la primera estructura ocular involucrada es la superficie corneal lo que produce una queratitis (principal causa de ceguera infecciosa en los países desarrollados), seguido de conjuntiva y párpados. El riesgo de recurrencia después del primer episodio de herpes ocular, es a un año del 10%, a dos años del 23% y a 10 años del 50%. (10,11)

La infección ocular recurrente, es causada por la reactivación del herpes en el ganglio trigeminal, el cual viaja por sus terminaciones nerviosas hasta el epitelio corneal en donde establece un patrón de replicación activa y produce un cuadro de queratitis de tipo epitelial o estromal, lo que representa una de las enfermedades más desafiantes desde el punto de vista del diagnóstico y tratamiento. (6,7)



Holland, establece la clasificación de la queratitis herpética basada en su anatomía y fisiopatología (8). Crea cuatro categorías: La primera incluye la afección del epitelio corneal de donde destacan la úlcera dendrítica y geográfica, las cuales pueden ser confundidas clínicamente con lesiones pseudodendríticas causadas por abrasiones corneales, Herpes Zoster, Acanthamoeba o úlceras bacterianas.

La segunda categoría engloba las alteraciones del estroma corneal, (48% son producto de la recurrencia), el cual puede afectarse de manera primaria en el caso de la queratitis necrotizante y la inmune o de manera secundaria como secuela de una queratitis epitelial o queratopatía neurotrófica. (8,9)

La queratitis estromal necrotizante (QEN), resulta de la invasión directa del virus en el estroma, simula una queratitis bacteriana severa. (10,11) La queratitis estromal inmune ocurre en 20% de los casos recurrentes, se cree es una reacción de hipersensibilidad retardada ante antígenos herpéticos retenidos en el estroma, lo que conlleva a inflamación constante de bajo grado, que progresa a cicatrización y neovascularización estromal.

La fuente de los antígenos ha sido debatida, se han hecho estudios de los infiltrados estromales en busca del origen. Con microscopía electrónica se han observado, partículas virales, incompletas o dañadas, en estos depósitos.(11) Sin embargo, el virus usualmente no se recupera directamente de homogenizados corneales.

Otro subtipo de queratitis estromal, es la endotelitis o queratitis disciforme, producto de una reacción inflamatoria a nivel del endotelio que resulta en su descompensación y edema corneal permanente. El mecanismo etiopatogénico es similar al anterior, una reacción inmunológica en contra de antígenos retenidos en el estroma aunque el papel del virus vivo como causa de la infección no se descarta. (8,9,10,11,12,13)

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha observado que en muchas ocasiones la enfermedad ocular herpética puede compartir datos clínicos similares a los de otras enfermedades oculares de causa infecciosa y la clínica resulta ser insuficiente para la confirmación del diagnóstico o conocer el estado de replicación viral.

## **JUSTIFICACIÓN**

Esta confusión en el diagnóstico clínico nos lleva a la búsqueda de herramientas alternativas. Actualmente, el método estándar utilizado para la confirmación de la presencia del HSV en todas éstas lesiones que no han sido tratadas; es el aislamiento de los viriones en cultivo de tejido, donde el efecto citopático confirma la presencia del virus, pero los resultados se obtienen en 2 ó 5 días después de haber realizado el inóculo.(3,4).

Por otra parte, existen nuevas herramientas de biología molecular que han demostrado ser más sensibles, rápidas, específicas y baratas en comparación con el cultivo celular. No requieren de células intactas o partículas virales viables para su detección como es el caso del inmunoensayo enzimático (disponible en un "kit" comercial llamado HERPCHEK) o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que las hace ideales para ser empleadas en la práctica clínica. (14,15,16,17,18,19)

## **HIPÓTESIS**

Con lo anterior, creemos que la prueba de PCR asociada a la de ELISA pueden determinar la presencia o ausencia del HSV-1 y saber si está en fase activa o no de replicación.

## **OBJETIVOS**

- I. Detectar la presencia de antígenos (ELISA) y del genoma (PCR) del HSV-1 en muestras oculares de pacientes con sospecha de queratitis herpética epitelial o estromal.
- II. Correlacionar los resultados encontrados en el laboratorio y en la clínica para determinar el posible estado de replicación viral.
- III. Comparar la utilidad de la lágrima como el del raspado corneal para lograr nuestro objetivo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se incluyeron pacientes del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana con sospecha clínica de queratitis herpética epitelial o estromal que no estuvieran recibiendo tratamiento con antivirales.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluyeron pacientes poco cooperadores, así como pacientes con diagnóstico comprobado de queratitis de otras etiologías como bacterianas, inmunes...

Se trató de un estudio de tipo prospectivo, longitudinal y experimental. Se incluyeron 46 pacientes y se clasificaron de la siguiente manera: 5 controles negativos, libres de herpes ocular. 9 con queratitis epitelial, todos con datos de actividad inflamatoria (úlceras dendríticas o geográficas).

20 se catalogaron como estromales (disciforme o intersticial), sólo un paciente presentaba una necrotizante con actividad importante y 12 pacientes fueron sospechosos de herpes epitelial o corneal, de los cuales 10 presentaban inflamación.

Se recolectaron muestras de lágrima (capilares) y/o raspado corneal (espátula de Kimura) en los pacientes con diagnóstico de queratitis herpética epitelial y estromal (se tomó el botón corneal en caso de haberse transplantado) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización para PCR o ELISA según el caso.

#### **PCR: Reacción de polimerización en cadena.**

Previa extracción de DNA (QIAamp DNA mini Kit), se procedió a realizar la técnica de PCR utilizando dos pares de iniciadores en busca del gen de la Timidina Cinasa del HSV-1. Uno denominado "universal" con la secuencia 5'-TTA TTG CCG TCA TAG CGC GG-3' y 5'- GGC GAC CTG TAT AAC GTG TT-3', que proporciona un producto de 272pb y el otro denominado "específico" con la secuencia 5'- AAT CGC GAA CAT CTA CAC CAC-3' y 5'- AAA GCT GTC CCC AAT CCT CCC-3', que da un producto de 500pb.

Todas las reacciones se procesaron en regulador 1X del PCR (Tris-HC 10mM, pH 8.3, KCl 50mM) conteniendo 1  $\mu$ L de cada iniciador (20  $\mu$ g/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de la solución "stock" de los 4 dNTP's (10 mM), 1.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ M), 0.3  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa recombinante (Life Technologies) en un volumen total de 25  $\mu$ L.

Se llevaron a cabo los siguientes ciclos de reacción para amplificar la secuencia denominada "universal": 94°C por 5 min., 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 56.5°C por 30 seg., 72°C por 1 min. y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Para la secuencia “específica” se realizaron ciclos de: 94 °C por 5 min., 40 ciclos de 95°C por 30 seg., 62 °C por 1 min., 72 °C por 30 seg, una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los productos de reacción se cargaron en un gel de agarosa al 3% para llevar a cabo la electroforesis con un poder de 100V por 30 minutos.

### **ELISA: Prueba para la detección de antígenos de HSV**

Es una prueba directa para la detección en general de antígenos de HSV, se basa en un anticuerpo policlonal de conejo anti-HSV para la captura de antígenos de HSV, contenidos en la muestra clínica. Una vez inmovilizado el antígeno se coloca un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado de ratón.

La cantidad de anticuerpo biotinilado unido al antígeno se mide por la reacción que se presenta al unirlo con el complejo de peroxidasa de rábano-estreptavidina, que cataliza la conversión de un sustrato cromogénico en un producto que produce color, el cual es leído en un espectrofotómetro con un filtro de referencia de 620nm con una sensibilidad del 95.6%.

## RESULTADOS

### **PCR: Reacción de polimerización en cadena.**

Como control positivo se empleó el DNA de la cepa McIntire de HSV-1. Como control negativo se utilizó una reacción con únicamente los reactivos necesarios para el PCR, excepto DNA molde. Se estandarizó la técnica de PCR universal y específica (fig.1), y se compararon los resultados de los controles contra muestras de DNA obtenidas de bacterias, plasma humano, lágrima y córnea de pacientes sanos. (fig.2)

Tanto la PCR denominada "Universal" como la "Específica" lograron la detección del genoma del HSV-1 en las mismas muestras, en los casos de queratitis epitelial se detectó el genoma en el 100% de las muestras de raspado corneal y en el 73.21% de lágrima.

Los pacientes catalogados como estromales (intersticiales o disciformes) sin datos de actividad no presentaron genoma del HSV. De los 12 pacientes catalogados como sospechosos de herpes ocular, sólo el 40% de las muestras de lágrima y córnea fueron positivos, en el resto no hubo detección. Sólo el caso de queratitis estromal necrotizante con datos de inflamación y necrosis activa presentó el genoma del HSV-1 en lágrima y córnea.

### **ELISA: Prueba para la detección de antígenos de HSV**

Sólo se logró la detección de antígenos del HSV en el 100% de las muestras de raspado corneal de pacientes con diagnóstico de queratitis epitelial, el resto de las muestras analizadas: lágrima de QHE y todos los casos estromales fueron negativos. Por otra parte, se detectaron los antígenos del HSV en el 40% de muestras de lágrima y córnea de pacientes con diagnóstico de sospecha de herpes ocular con datos de inflamación.

## DISCUSIÓN

Las enfermedades oculares causadas por microorganismos (bacterias, hongos, parásitos y virus) pueden convertirse en un reto diagnóstico y de tratamiento. Principalmente en el caso de las partículas virales, en donde el diagnóstico con los métodos convencionales (cultivo) es mucho más tardado y poco sensible lo que se traduce muchas veces en un tratamiento específico tardío y un pronóstico visual fatal.

El virus del herpes simple, representa el principal ejemplo de agente infeccioso causante de un espectro muy amplio de enfermedad ocular, que en la actualidad representa la causa infecciosa principal de ceguera en los países desarrollados.

En lo anterior, se fundamenta nuestro trabajo, en el cual decidimos implementar nuevas herramientas de biología molecular como el PCR y el inmunoensayo enzimático para la detección oportuna y rápida de pequeñas cantidades de partículas virales contenidas en muestras oculares, que a veces resultan ser insignificantes.

En este protocolo se explica como en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana se logró la implementación de las técnicas de PCR y de inmunoensayo enzimático denominada HERPCHEK, específicas para la detección del genoma o antígenos del HSV, a partir de muestras oculares, ya fueran de lágrima o de córnea de pacientes con sospecha de enfermedad ocular herpética.

## CONCLUSIONES

Con los resultados anteriores, podemos suponer que más del 70% de los pacientes que sean catalogados en la clínica como queratitis herpética epitelial con datos de actividad inflamatoria, es decir, la presencia de algún defecto epitelial sugestivo de herpes, serán portadores del genoma y antígenos del HSV-1 en muestras de lágrima o córnea; pero principalmente y con mayor sensibilidad en las muestras de raspado corneal.

Además, se observa que en éstos pacientes se logra correlacionar el estado de inflamación activa con la presencia de un virus en fase de replicación. Por otra parte, los pacientes con diagnóstico de queratitis herpética estromal de tipo disciforme o intersticial, no presentaron genoma y/o antígenos del HSV-1 en muestras de lágrima y córnea (en la mayoría de los casos se analizó todo el botón corneal).

Coincidimos con la literatura mundial en donde se establece que la gran mayoría de éstos casos son producidos por una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T ante antígenos de HSV retenidos en el estroma, aunque no encontramos ninguno. Planemos realizar microscopía electrónica de córneas con éste diagnóstico en busca de las partículas virales embebidas en el estroma. (6,7,10,13)

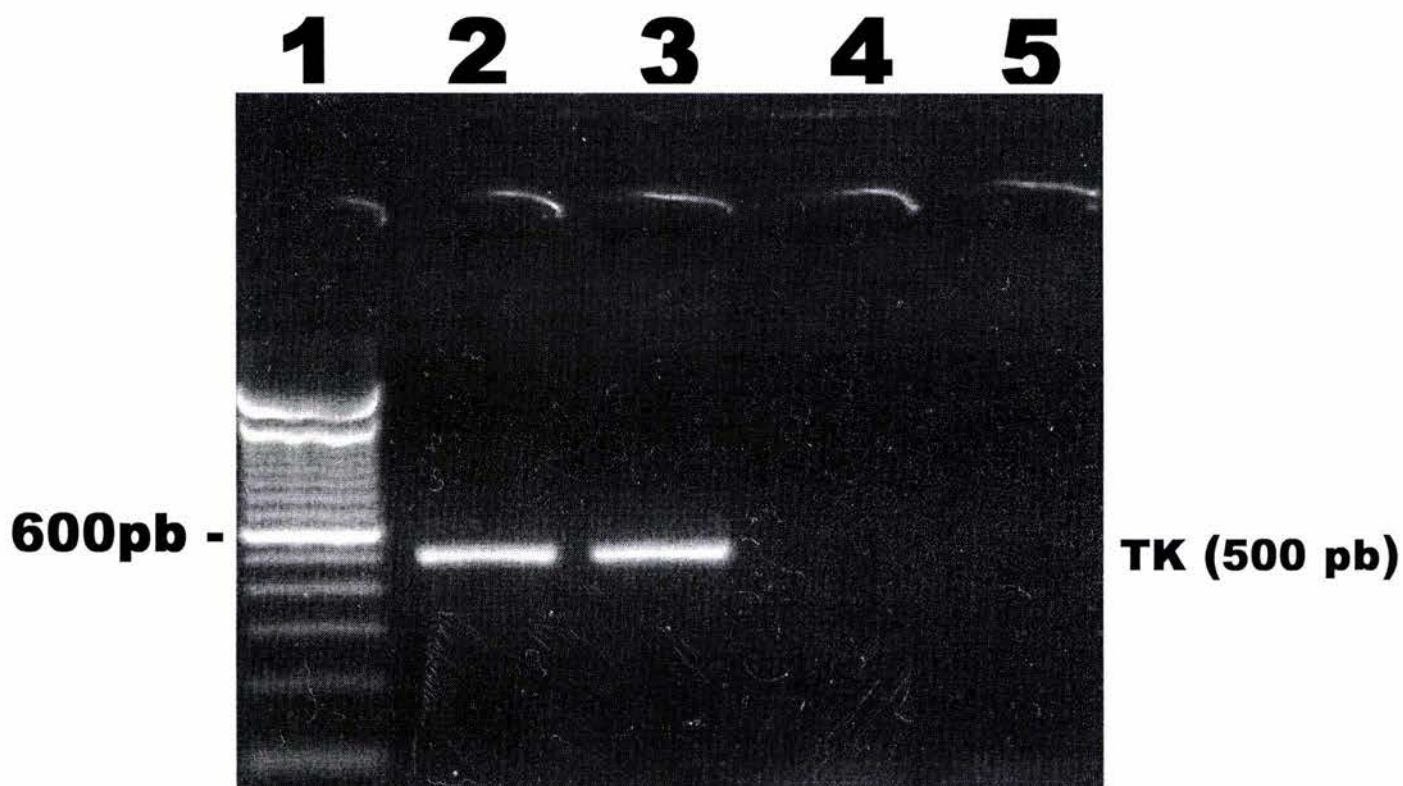


## BIBLIOGRAFÍA

1. Roizman B. Sears A. Herpes Simplex viruses and their replication. En: B.N. Fields, D.M. Knipe, editors. Fields Virology. 3ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Press, 1996. p. 2231-2278
2. Wagner E. Herpes Simplex virus research. Disponible en: URL: <http://darwin.bio.uci.edu/faculty/wagner/movieindex.html>
3. CDI, Herpes simplex viral infections (monografía en CD-ROM). Kaufman H, Barron B, McDonald M. 2ed. EUA. 1999
4. McLeod S. Viral Keratitis. Yanoff M, Duker J. editors. Ophthalmology. 1ed. Mosby Press, 1998. p.9.1-9.10
5. CDI, Herpes Simplex Keratitis (monografía en CD-ROM). Duane's P, O'Day D. Duane's Ophthalmology, Vol.4, Cap. 19. 2000
6. Kaye S, Lynas C, Patterson A, Risk J, McCarthy K, Hart C. Evidence for herpes simplex viral latency in the human cornea. . Br J Ophthalmol 75,195-200. 1991
7. Streilein W, Reza Dana, Ksander B. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. Immunology Today. Sep. Vol.18 (9). 443-449.1997
8. Holland E, Schwartz G. Clasificación y tratamiento de la queratitis por virus del Herpes Simplex. Clinical Signs en Oftalmología. Stein R. Ed. Vol. XIX (4). Texas. 1999
9. Liesegang T. Classification of Herpes Simplex Virus Keratitis and Anterior Uveitis. Cornea 18(2):127-143,1999
10. Holbach L, Font R, Naumann G. Herpes Simplex Stromal and Endothelial Keratitis. Ophthalmology 97:722-728. 1990
11. Meyers-Elliott R, Pettit T, Maxwell A. Viral Antigens in the human ring of herpes stromal keratitis. Arch Ophthalmol 98:897-904,1980
12. Robert PY, Traccard I, Adenis JP, Denis F, Ranger-Rogez S. Multiplex detection of herpesviruses in tear fluid using the "stair primers" pcr method: Prospective study of 93 patients. J Med Virol 2002 Apr; 66 (4):506-11

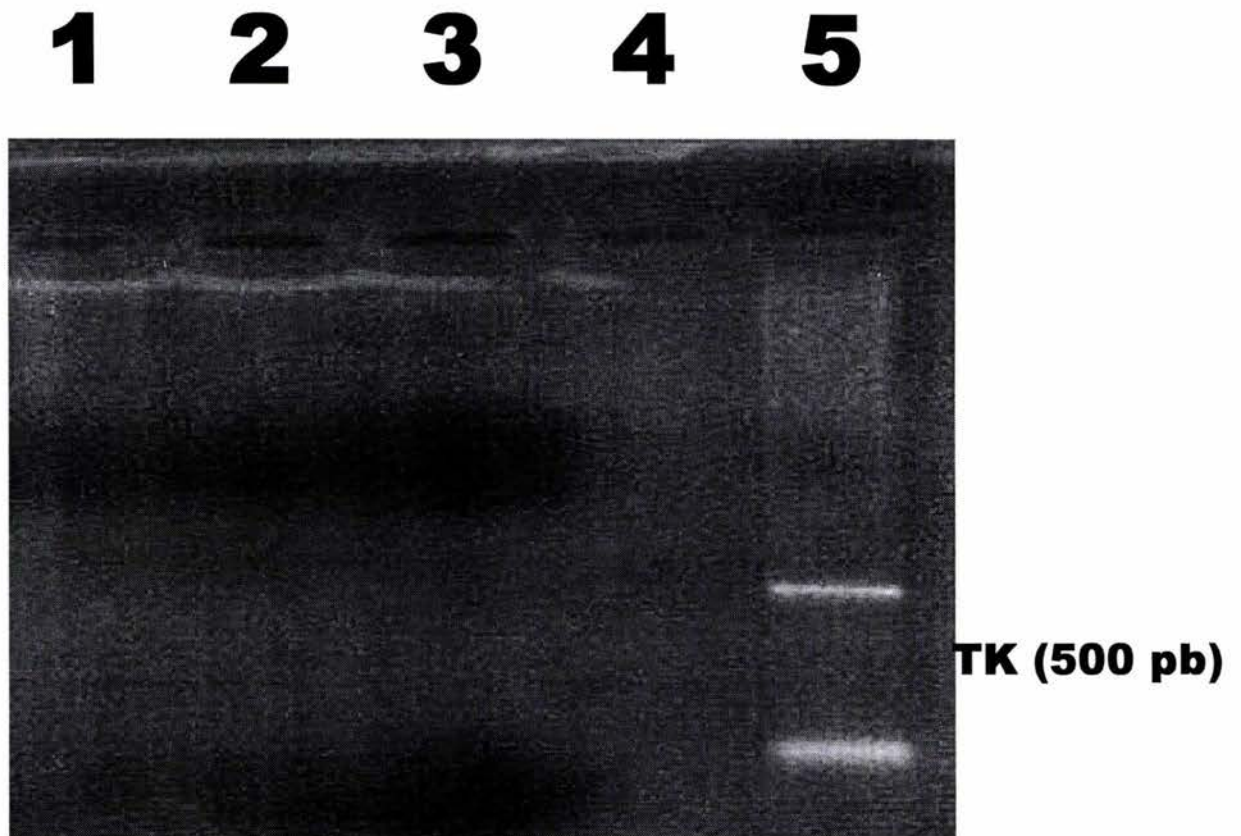
13. Vinagre C, Martínez MJ, Vogel M, Traipe L, Stoppel J, Squella O. Role of Herpes Simplex virus in the immune stromal keratitis. *Rev Med Chil* 2001 Mar;129(3):259
14. NEN™ Life Science Products. HERPCHEK® PRUEBA ANTIGÉNICA DIRECTA DEL VIRUS HERPES SIMPLEX(HSV). Catalog Number. NEA106. Manual de Instrucciones. Patente U.S. 4,228,237
15. Kaye S, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, Grinfeld E, Tullo A, et al. Human Herpesviruses in the cornea. *Br J Ophthalmol* 84(June):563-571, 2000
16. Kaye SB, Shimeld C, Grinfeld E, Maitland N, Hill T, Easty D. Non-traumatic acquisition of herpes simplex virus infection through the eye. *Br J Ophthalmol* 76:412-418. 1992
17. Gelderen B, Van der Lelij A, Treffers F, van der Gaag R. Detection of herpes simplex virus type 1,2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons. *Br J Ophthalmol* 84 (Nov):1238-1243. 2000
18. Bezold G, Volkenandt M, Gottlober P, Peter RU. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. *Mol Diagn* 2000 Dec;; 5 (4):279-84
19. N Koizumi, K Nishida, W Adachi, M tei, Y Honma, A Dota. Detection of herpes simplex virus DNA in atypical epithelial keratitis using PCR. *Br J Ophthalmol* 1999, 83:957-960

# FIGURAS



**Fig 1. Reacción de PCR para la secuencia denominada específica de HSV-1.** Electroforesis de los productos de amplificación. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2,3) Mezcla con DNA del control +. (4,5) Mezcla con DNA del control negativo, el cual cuenta con todos los reactivos para la reacción de PCR, excepto un DNA molde.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



**Fig. 2 PCR “Específica” para controles negativos con DNA.** Electroforesis de los productos de amplificación. (1) DNA de bacteria gram positivo. (2) DNA de célula humana. (3,4) Extracción de DNA a partir de muestras de lágrima y de raspado de córnea de un paciente con diagnóstico de queratitis herpética epitelial que recibió tratamiento con antivirales. (5) Mezcla con DNA del control +