

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE VIRUS HERPES SIMPLEX EN COSTA RICA

Laya Hun, Luis G. Fuentes\*,

### RESUMEN

*El presente trabajo aporta información sobre los métodos de uso corriente usados en el laboratorio de virología de la Universidad de Costa Rica para el diagnóstico por aislamiento y serología de virus herpes simplex 1 y 2, en pacientes que han acudido para su estudio.*

*Se diagnosticó 28 pacientes, 4 asintomáticos, 6 con lesiones orales, 12 con lesiones genitales, 3 con lesiones en piel y 3 con encefalitis.*

*Con los resultados obtenidos, se pudo observar en estos pacientes la característica de recurrencia y la localización anatómica de ambos serotipos. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1987; 8(3):143-148].*

### INTRODUCCION

Desde que se reconoció que hay dos tipos de virus herpes simplex (HSV) HSV-1 y HSV-2 (1,2), se ha puesto en evidencia las diferencias entre ellos, mediante serología, morfología de placas (12, 17, 19,33), características de crecimiento en cultivos celulares y recientemente, por diferencias en el análisis de polipéptidos estructurales y secuencia de nucleótidos en el ADN viral (6, 7, 8, 16, 35, 36, 37). A pesar de tener características diversas de crecimiento, los herpes virus se clasifican en una misma familia denominada HERPETOVIDAE con base en su estructura, morfología, tamaño y tipo de ácido nucleico. Los virus que la conforman son: Epstein Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV), varicela-Zoster (VZV) y HSV 1 y 2, siendo estos últimos los más estudiados.

Los virus herpes son partículas grandes de 150-170 nm de diámetro, con un ácido nucleico del tipo ADN lineal de doble banda, una cápside proteica y una cubierta lipídica. Al infectar una célula, estos virus inhiben la síntesis de macromoléculas y ácidos nucleicos celulares (18).

Como todos los virus, los HSV son parásitos intracelulares obligatorios, que necesitan de una célula viva para su multiplicación, tal como cul-

tivos celulares, huevos embrionados y animales. La infección con HSV-1 ocurre a temprana edad, entre los 5 meses y 5 años, y es generalmente inaparente (1). La infección primaria con HSV-2 ocurre más tarde y se transmite normalmente por contacto sexual y a través del canal vaginal durante el parto (4, 5, 15, 23). La Clínica atribuida a estos virus se resume en el Cuadro 1. Los HSV son capaces de una variedad de interacciones con su célula hospedera y como consecuencia de esta interacción se puede dar:

- 1) muerte celular, caracterizada por biosíntesis de progento viral, infección y destrucción tisular originando respuestas en el individuo que van desde infecciones asintomáticas subclínicas hasta enfermedad fatal (21).
2. latencia o persistencia viral, producto de una infección y multiplicación en la cual los virus no son totalmente eliminados por el organismo, sino que viajan a núcleos neuronales y de ahí a nervios sensoriales para establecer la latencia. Es una característica de los virus herpes que permanecen en la persona infectada de por vida. Es una observación común y uno de los misterios más grandes de la virología: el que personas infectadas con HSV mantengan una infección latente por años. Estos virus pueden dar cuadros de recurrencia, activados por una variedad de estímulos, que pueden ser ambientales, químicos, hormonales, factores psicológicos y otros (9, 10, 13, 24).
3. Oncogenia. La correlación del cáncer de cérvix con el HSV-2 ha sido estudiada intensamente, tanto seroepidemiológicamente (2, 27, 28, 30) como virológicamente (1, 29). La hipótesis que señala a los HSV-2 como factor causal del cáncer merece seria consideración, dado su patrón de transmisión venérea y sus propiedades biológicas con potencial oncogénico para el hombre. El diagnóstico de laboratorio se puede hacer tanto por el aislamiento mismo del agente a partir de la lesión, el cual es el método más sensible, o bien por serología. El primero demuestra la presencia del virus en el paciente, y por diferentes procedimientos serológicos

\* Laboratorio de Virología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

se puede determinar el serotipo. La serología, como método de diagnóstico único, no es muy efectiva ya que, estos virus invaden al ser humano en temprana edad convirtiendo al paciente en seropositivo y además, existe una reacción cruzada entre ambos por los métodos serológicos convencionales, siendo su resultado de difícil interpretación y de poco valor diagnóstico (25, 26, 27,32).

El diagnóstico se puede realizar utilizando técnicas como la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, inmunoperoxidasa, técnicas de biología molecular tales como el estudio de ADN con enzimas de restricción por electroforesis y otras (14, 16,34,36,37), que aunque pueden consumir solo unas pocas horas para resolver un diagnóstico, tienen el inconveniente del alto costo de equipos y reactivos, lo cual se hace más evidente cuando se trata de diagnósticos aislados y no en forma masiva. La

frecuencia de las lesiones herpéticas en la población demanda la necesidad de establecer un diagnóstico preciso de herpes en algunas condiciones, para lo cual es necesario contar con técnicas sensibles, rápidas y ojalá de bajo costo. Debido a que el Laboratorio de Virología, de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR) no cuenta con estos recursos, el diagnóstico se realiza por el método directo de aislamiento del agente y su potencialidad de formar placas usando cultivos celulares. La confirmación del tipo de virus aislado se realiza por neutralización con sueros específicos.

El presente trabajo relata la experiencia que se ha tenido en el laboratorio de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica con el virus herpético en pacientes que han acudido para su estudio.

**CUADRO 1**  
**DIVERSIDAD DE CUADROS CLINICOS ORIGINADOS POR HSV**

Sitio Anatómico	TIPOS DE VIRUS	
	HSV-1 (niños y adultos)	HSV-2 (neonatos)
<b>Labios</b>		
Fuegos	+++ <sup>a</sup>	& <sup>b</sup>
<b>Mucosas</b>		
a. Oral	+++	+
b. Genital	+	+++
<b>Ojos</b>		
Queratitis	+++	+
<b>Piel</b>		
a. Dermatitis herpética	+++	+
b. Eczema herpético	+++	+
c. Eczema traumático	+++	+
<b>Sistema Nervioso Central</b>		
Encefalitis	+++	+++

a. +++ = Mayor frecuencia  
b. + = Menor frecuencia

## MATERIAL Y METODOS

Parte de la población en estudio está constituida por pacientes que han acudido al laboratorio de virología de la Facultad de Microbiología remitidos por médicos particulares, especialmente ginecólogos o bien por iniciativa propia, algunos de los cuales ya habían tenido estos cuadros. Otros son pacientes hospitalizados por causas diversas.

En el caso de muestras genitales, bien sea de cérvix o de pene, las muestras consisten en frotis de lesiones tomados con una torunda de algodón o de alginato de calcio. Las muestras de los pacientes con problemas de estomatitis (fuegos) o cuadros de piel, fueron tomadas de igual forma, rompiendo las vesículas frescas con una torunda de algodón.

Finalmente, en los pacientes con sintomatología nerviosa o bien los que forman parte de una población de voluntarios que se estudiaban en este laboratorio, las muestras que se tomaron eran frotis faríngeos y LCR, o sólo el primero de ellos, según el caso.

Las muestras fueron suspendidas en un medio de transporte (excepto LCR) que consistía en una solución balanceada de Hanks, a la cual se le adicionó 500 U de penicilina y polimixina y 500 ug de dihidroestreptomina. Las muestras se mantuvieron a 4°C por 30 minutos y finalmente se almacenaron a -70°C.

Se empleó una línea establecida de riñón de mono verde africano (VERO) crecida en este laboratorio en medio 199 complementado con 5 por ciento de suero fetal de ternero y 0.11 por ciento de bicarbonato. Se preparó monocapas celulares confluentes en tubos de vidrio empleando  $1.5 \times 10^5$  células por tubo.

Igualmente se utilizó fibroblastos de embrión de pollo preparados a partir de embriones de 810 días obtenidos en incubadoras locales y procesados según la técnica de Robín (31).

Con estas células se preparó capas confluentes usando botellas de cultivo de 20 ml, usando para su crecimiento medio de lactalbumina completado con 10 por ciento de suero fetal de ternero y 0.11 por ciento de bicarbonato, 100 U de penicilina, polimixina

B y 100 ug de estreptomina. Los medios de cultivo empleados fueron el de lactalbumina, 199 y MEM que son medios deshidratados adquiridos de la casa GIBCO. El medio de plaqueo Mínimo Esencial de Eagle se preparó a partir de soluciones stock de vitaminas, aminoácidos, glutamina y solución salina de Earle.

El aislamiento del virus se logró inoculado monocapas confluentes de células Vero con 0.2 ml de la muestra. Después de una hora de absorción a temperatura ambiente y con agitación, se drenó el inóculo y se realimentaron las células con medio de mantenimiento con 2 por ciento de suero fetal de ternero y 0.22 por ciento de bicarbonato. Los cultivos se incubaron a 37°C con observación diaria, utilizando un microscopio invertido, buscando el efecto citopatogénico típico que producen estos virus.

La determinación del tipo de virus de aquellos aislamientos positivos en células Vero, se identificaron biológicamente en cultivos de embrión de polio por la técnica de placas (11.31). Se inoculó botellitas con monocapas confluentes con 0.2 ml. de una dilución adecuada del virus y se dejó absorber una hora a temperatura ambiente con agitación continua.

A continuación se agregó una sobrecapa de medio formado por partes iguales de MEM 2X y Agar Noble 2 por ciento. Después de incubar a 37°C por tres días, se reveló con una segunda sobrecapa del mismo medio adicionado de Rojo Neutro 1/20.000. Las placas se visualizaron 24 horas después.

La identidad del virus fue verificada mediante la técnica de neutralización, utilizando antisueros específicos contra HSV preparados en conejo. Brevemente, 0.2 ml del virus conteniendo 100 DL50 citopáticas se mezcló con 0.2 ml de suero conteniendo 20 unidades neutralizantes. Se incubó por una hora a 37°C en baño maría. Al cabo de este tiempo se inocularon tubos de Vero con 0.2 ml de la mezcla, se dejaron absorber una hora a temperatura ambiente y se realimentaron los tubos con medio fresco. Se observaron los tubos diariamente por ausencia de efecto citopatogénico.

## RESULTADOS

De las muestras estudiadas reportamos las positivas agrupadas según el sitio de la lesión. (Cuadro 2).

CUADRO 2

### SITIOS DE LESION Y TIPO DE HERPESVIRUS EN 28 PACIENTES

Sitio de la lesión	HSV-1	HSV-2	TOTAL
Frotis faríngeo (asintomáticos)	4	0	4
Oral (labial)	6	0	6
Genital	3	9	12
Piel*	0	3	3
Encefalitis	3	0	3
TOTAL	16	12	28

\* Uno en nariz, dos en glúteo.

## DISCUSION

Los virus herpes simplex se caracterizan por presentar afecciones en piel, mucosas y pliegues mucocutáneas, en donde producen lesiones papulosas, llenas de linfa, que contiene abundantes partículas virales. En Otros casos, como en las encefalitis herpéticas, el virus podría localizarse en la orofaringe, aún en ausencia de lesiones.

La frecuencia de estas lesiones en la población(31) y las complicaciones clínicas y genéticas que los HSV pueden causar, demanda la necesidad de establecer el diagnóstico preciso con técnicas sensibles, rápidas y posibles de realizar con la infraestructura disponible, hasta estar en condiciones de utilizar la tecnología que permita hacer un diagnóstico más rápido y preciso (anticuerpos monoclonales, estudio de ADN, etc.).

Cabe recalcar que se pudo constatar tanto por historia como por positividad de cultivo, las características de recurrencia clínica de las lesiones herpéticas (datos no publicados).

De los cultivos realizados y por la identificación serológica de los HSV de acuerdo a sitio de lesión encontramos algunos datos interesantes que contradicen el "dogma" de que el HSV-1 es exclusivamente extragenital y el HSV-2 genital, incluso el HSV-2 era así denominado (Herpes simplex genital), pues en 25 por ciento de las lesiones herpéticas genitales se aisló HSV-1.

Por otro lado, en las lesiones de piel (no labial) se aisló HSV-2, incluso uno en nariz. Estos datos pueden deberse a los hábitos sexuales de los pacientes o una predisposición genética a alguno de los dos tipos de HSV, son necesarios más estudios para dilucidar este punto.

La importancia de un diagnóstico de laboratorio por HSV, radica principalmente, como en todas las infecciones, en la identificación del agente causal, para poder tomar medidas de tratamiento, prevención de contagio y en el caso especial de herpes genital en mujeres embarazadas, evitar el nacimiento de niños con herpes neonatal (22).

## ABSTRACT

This study provides information on routine methods of isolation and serology of Herpes Simplex virus types 1 and 2 used in the virology laboratory of the University of Costa Rica.

Diagnosis was made in 28 patients, 4 asymptomatic, 6 with oral lesions, 12 with genital lesions, 3 with skin lesions and 3 with encephalitis. We determined these patients recurrence and anatomic sit of infection with both serotypes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aurelian, L. Possible role of herpesvirus hominis type 2 in cervical carcinoma. *Federation Proc.* 1972; 31: 1651-1659.
2. Aurelian, L. Virions and antigens of Herpes virus type 2 in cervical carcinoma. *Cancer Res.*1973; 33: 1539-1547.
3. Aurelian, L. Persistence and expression of the Herpes Simplex Virus type 2 genome in cervical tumor cells. *Cancer Res.* 1974; 1126-1135.
4. Aurelian, L. Sexually transmitted cancers. The case for genital herpes. *H. Amm. Ven. Sic. Asoc.* 1976; 2:10-20.

6. Brautigham, a.R., D. D. Richman & M.N. Oxman. Rapid typing of Herpes Simplex Virus isolates by deoxyribonucleic acid: deoxiribonucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 12: 226-234.
7. Buchman, T.C., B. Roizman, G. Adams & H. Stover. Restriction endonucleases fingerprint of Herpes Simplex Virus DNA: A novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. *J. Infect. Dis.* 1978; 138: 488-498.
8. Buchman, T.G, B. Simpson, T.C Nosal & N. Roizman. The structure of Herpes Simplex Virus DNA and its application to molecular epidemiology. In: *Genetic variation of virus*. The New York Academy of Science. 1980: 279-290.
9. Docherty, J.J. & M. Chopan. The latent Herpes Simplex Virus. *Bacteriol. Rev.* 1974;38:337-355.
10. Donnemberg, A.D., E. Chaikof & L Aurelian. Immunity to Herpes Simplex Virus Type 2: Cell mediated immunity in latently infected guinea pigs. *Infect. and Immunol.* 1980; 30: 99-109.
11. Dulbecco, R. & M. Vogt. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 1954; 99: 167-182.
12. Figueroa, M.E. & W.E. Rawls. Biological Markers for differentiation of herpesvirus stains of oral and genital origin. *J. Gen. Virol.* 1969; 4: 259-267.
13. Gunn, C.S. & P.N. Goldwater. An in vitro reactivation system for investigation of herpes simplex virus latency. *J. Med. Virol.* 1986; 18: 247-254.
14. Hughes. J.h., D N. Mann & V.V. Hamparian. Virus isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of Herpes Simplex Virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24 487-489.
15. Kessler, I. Human cervical cancer as a venereal disease. *Cancer res.* 1976; 36: 783-791.
16. Klein, R.J. The pathogenesis of acute, latent and recurrent Herpes Simplex Virus infections. *Arch. Virol.* 1982; 72: 143-168.
17. Lowry, S.P., J.L. Melnick & W.E. Rawls. Investigation of plaque formation in chick embryo cells as a biological marker for distinguishing herpes simplex virus type 2 from type 1. *Gen. Virol.* 1971; 10: 1-9
18. Marcon, J.M. & L.S. Kucera. Stimulation of human cell DNA synthesis by defective Herpes Simplex type 2. *Virol.* 1979; 98: 364-372.
19. Munk, K & G. Ludwing. Properties of plaque variants of Herpes Virus Hominis strains of genital origin. *Arch. GGes. Virusforsch* 1972; 57: 308-315.
23. Nahmias, A.J. & W.E. Josey. Herpes Simplex Viruses 1 and 2. In: *Viral infections of humans. Epidemiology and control*, edited by: A.S. Evans, Plenum, New York. 1932; 351 -372.
24. Nishiyama, Y. & F. Rapp. Regulation of persistent infection with Herpes Simplex Virus in vitro by hydrocortisone. *J. Virol.* 1979; 31; 842-844.
25. Pauls, F.P. & WR. Dowdle. A serologic study of herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. *J. Immunol.* 1967; 98: 941-947.
26. Pérez, T.R., S.V. Juchau & R. Alvarez. Detection of Herpes Simplex Virus with Primary rabbit kidney and HSV antigen ELISA. *Lab. Med.* 1986; 17:535-536.
27. Rawis, W.E., K. Iwamota, E. Adam & J.L. Melnick. Measurements of antibodies to herpesvirus types 1 and 2 in human sera. *J. Immunol.* 1970; 104: 599-606.
28. Rawls, W.E., E. Adams & J.L. Melnick. An analysis of seroepidemiological studies of herpesvirus 1 and 2 carcinoma of the cervix. *Cancer Res*
29. Rawls, W.E, Tompkins, W.A. & J.L. Melnick. The association of herpes virus type 1 and 2 and carcinoma of the uterine cervix. *Am. J. Epidemiol* 1986; 89: 547-554.
30. Robin, H. Chick embryo cells. In: *Tissue Culture methods and applications*. kruse, P.F. & M.K. Patterson. Academic Pres. New York, USA 1973; 119-123.
31. Rooney, J. F. Epidemiology of Herpes Simplex. In: Straus S.E. moderator. Herpes Simplex Virus infection biology, treatment and prevention. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 404-419.
32. Russel, W.C. A sensitive and precise plaque assay for Herpesvirus. *Nature* 1962; 195: 1028-1029.
33. Salmon, V.C., B.R Turner, M. J. Speranza & J. Overall. Rapid detection of Herpes Simplex Virus in clinical specimens by centrifugation and immunoperoxidase staining. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 23: 283-286.
34. Schuster, V. B., H. Matz, A. Wiegand, B. Polack, D. Corsten & D. Neuman-Haefling. Nucleic Acid Hybridization for detection of Herpes Viruses in Clinical specimens. *J. Med. Virol.* 1986; 19: 227- 286.
35. Schuster, V.B., H. Matz, B. Wiegand, B. Traub & D. Neuman-Haefling. Detection of Herpes Simplex Virus and Adenovirus DNA by Dot Blot Hybridization using in vitro synthesis RNA transcripts. *J. Virol. Meth.* 1986; 291-299.

36. Voets-Drust, E. Comparison of cytopathic effect and ELISA using monoclonal antibodies for typing Herpes Simples virus isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1986; 5:473-475.

37. Watson, K., J.G. Stevens, J. Cook & J. H. Subak Sharpe. Latency competence of thirteen HSV-1 temperature sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* 1980; 49:149-159.