

## ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL HERPES GENITAL

**David Navarro Ortega, David Navalpotro Rodríguez y Oscar Fraile Santos**

**Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia**

Los virus *Herpes simplex* (VHS) tipos 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2), dos alfa herpesvirus estrechamente relacionados, causan el herpes genital, un problema de salud pública global, de rango epidémico, cuya verdadera dimensión empezamos a advertir. En nuestro entorno, el herpes es la tercera enfermedad de transmisión sexual (ETS) por orden de frecuencia y la primera causa de úlceras anogenitales. Se estima que en el mundo hay alrededor de 90 millones de individuos que sufren la enfermedad crónica recurrente sintomática y, lo que resulta más inquietante, el número de infectados que desconocen serlo podría exceder esa cifra. En España, al igual que en otros países de la Europa mediterránea, la prevalencia de la infección por VHS-2 en la población general se sitúa en torno al 5-10% y alcanza el 25-40% cuando se considera únicamente a individuos atendidos en clínicas de ETS.

El VHS-2 causa la mayoría de los herpes genitales, si bien, durante los últimos años, se ha producido un incremento del número de casos debidos al VHS-1, particularmente en occidente, en adolescentes y adultos jóvenes; este hecho es atribuible al aumento de los adolescentes susceptibles al VHS-1 y a un cambio sustancial en el modelo de conducta sexual de la población.

La primoinfección genital por ambos VHS es, frecuentemente, asintomática o “subclínica”. En su forma característica, el herpes anogenital sintomático cursa con lesiones vesiculosas y ulcerativas dolorosas situadas, generalmente, en los labios y el introito vaginales, glande y prepucio, adenopatías regionales, y, especialmente en la mujer, con disuria; no es infrecuente que se acompañe de síntomas generales tales como fiebre y cefalea. La infección previa por el VHS-1 suele aminorar la sintomatología asociada a la primoinfección por el VHS-2. Las reactivaciones son asintomáticas en más del 80% de los casos, independientemente del VHS causal, y los episodios de recurrencia sintomáticos son, en general, menos llamativos clínicamente que los vinculados a las primoinfecciones.

Los VHS-1 y VHS-2 difieren en cuanto a su capacidad de causar lesiones anogenitales recurrentes; el VHS-2 las genera con mayor frecuencia que el VHS-1, particularmente durante el año siguiente a la primoinfección, en una proporción de 5:1. Es de gran interés epidemiológico, por otra parte, el hecho de que mientras que el VHS-1 se excreta infrecuentemente en ausencia de lesiones, el VHS-2 lo hace habitualmente, de forma intermitente (entre 4-75% de los días del año) e impredecible (no hay manera de prever quiénes lo harán, en qué medida y con qué frecuencia), de modo que la mayoría de infecciones *de novo* por el VHS-2 son consecuencia de contactos sexuales con individuos que excretan el virus de forma “subclínica” o asintomática; no hay duda de que la población sexualmente activa que ignora estar infectada por el VHS-2 es el reservorio más trascendente del virus y la fuente de diseminación de la infección.

### DIAGNÓSTICO DEL HERPES GENITAL

Cuando se manifiesta en su forma prototípica, el herpes anogenital es relativamente fácil de diagnosticar; se tiene la impresión, sin embargo, de que se trata de una afección “infradiagnosticada”; en este sentido, conviene tener presente que las formas atípicas de

presentación (pequeñas fisuras, abrasiones o eritema doloroso en territorio mucocutáneo genital) no son excepcionales.

En todo caso, la intervención del laboratorio de microbiología en el diagnóstico del herpes genital es inexcusable y crucial: permite el diagnóstico de las formas atípicas aludidas, hace posible la tipificación del VHS causal, lo que permite inferir el curso de la infección crónica y la detección de excretores asintomáticos de virus -especialmente relevante en la prevención del herpes neonatal-, y, en definitiva, resulta determinante para la monitorización correcta de la infección herpética.

## EL CULTIVO, EL EXAMEN DIRECTO TRAS TINCIÓN Y LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO VIRAL

Durante los últimos 20 años el cultivo celular ha sido el método diagnóstico de referencia. Es esencial conocer lo siguiente en relación con el cultivo de los VHS. En primer lugar, la probabilidad de recuperar estos virus en un cultivo celular depende críticamente de varios factores:

- **rapidez con que se inocula la muestra:** existe una razón inversa entre el tiempo de demora en el procesamiento del espécimen y la probabilidad de cultivar estos virus; si la muestra no va a ser inoculada inmediatamente conviene mantenerla en medio de transporte a 4°C hasta su procesamiento, si éste se produce en las siguientes 48 h, o a -20°C si el retraso es mayor.
- **carga viral presente en la muestra:** es más fácil recuperar los VHS a partir de las lesiones presentes en la primoinfección que de aquellas que se producen en las recurrencias, en relación con el hecho de que la carga viral en las primeras suele ser mayor que en éstas (más de 10<sup>6</sup> viriones frente a 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> por 0,2 ml de inóculo).

En ausencia de lesiones, el cultivo fracasa frecuentemente; en presencia de ellas, depende: los VHS se aíslan en más de un 90% de casos cuando se cultivan vesículas (el líquido intravesicular es la mejor muestra posible) y, en menor medida, cuando se inoculan pústulas (80%); el rendimiento del cultivo disminuye sensiblemente (70%) cuando se procesa el escobillonado de la base de las úlceras (no deben utilizarse escobillonos de alginato cálcico) y resulta escasamente productivo cuando se emplean costras homogeneizadas (<25%); el cultivo del exudado uretral permite en ocasiones, sobre todo en el varón, el aislamiento de los VHS; por último, el escobillonado rectal en pacientes con herpes anal es habitualmente inútil.

Para detectar la excreción "subclínica" o asintomática de los VHS, en especial del VHS-2, el lavado cervicovaginal es la mejor muestra posible, sensiblemente más productiva que el escobillonado endocervical o vaginal, si bien la dilución de la muestra inherente a este tipo de procesamiento reduce la probabilidad de éxito cuando el nivel de excreción viral es bajo.

- **cultivo celular utilizado:** si bien los VHS pueden cultivarse en una amplia variedad de tipos celulares, las células primarias de riñón de conejo y las células de rhabdomiosarcoma resultan especialmente ventajosas; no obstante, el uso de líneas celulares diploides como las MRC-5 (fibroblastos de pulmón fetal humano) es una buena alternativa, por cuanto son sufridas y están disponibles comercialmente. Las líneas celulares continuas como las Vero resultan menos sensibles que las anteriores a la infección por los VHS.

En segundo lugar, el efecto citopático (ECP) que causan los VHS tarda en ser observable una media de 1-3 días. Cuando la carga viral presente es de escasa magnitud el plazo puede alargarse hasta los 5-7 días; aunque el VHS-1 ocasiona un ECP de mayor extensión que el VHS-2 (forma placas), en la práctica no es fácil distinguirlos y, en todo caso, la observación de un ECP compatible no es suficiente para diagnosticar la infección

por los VHS. La presencia de sustancias tóxicas en el inóculo o la infección por el VVZ, y en menor medida por el CMV o los Adenovirus, pueden generar ECPs indistinguibles de los que producen los VHS. Resulta pues necesario identificar el VHS, para lo cual el uso de anticuerpos monoclonales específicos de tipo resulta óptimo.

El tiempo de detección de los VHS puede acortarse hasta 18-48 h si se inoculan monocapas en el formato de *shell vial*, se centrifugan los tubos y se tiñen aquéllas con anticuerpos monoclonales frente a proteínas virales marcados con fluorocromos, biotina o enzimas, o si se emplea el denominado método ELVIS (*Enzyme-linked virus-inducible system*), recientemente comercializado por Diagnostic Hybrids (USA); en este procedimiento se emplean células de riñón de hámster que expresan de forma estable el gen *lacZ* de *Escherichia coli* bajo el control del promotor del gen UL-39 del VHS tipo 1; en presencia de los VHS en el inóculo, las células del cultivo infectadas producen grandes cantidades de  $\beta$ -galactosidasa y se tiñen de azul tras la adición a éste de un derivado del galactopiranosido; tanto el método del *shell vial* cuanto el ELVIS permiten la tipificación de los VHS.

El examen directo de la muestra tras tinción de Papanicolau o Tzanck permite, en ocasiones, advertir la presencia de células gigantes de citoplasma deslustrado que contienen las inclusiones intranucleares de Cowdry (tipo A) o la de células sincitiales gigantes. El examen citopatológico de las muestras es barato, pero poco sensible y relativamente inespecífico.

La detección de antígeno viral mediante inmunofluorescencia (IF) o ELISA es una opción diagnóstica sencilla y rápida (tiempo de ejecución menor de 5 h), y, obviamente, no precisa de la viabilidad del virus presente en la muestra, pero resulta desfavorable en relación con el cultivo celular puesto que su sensibilidad, cuando se emplean especímenes genitales, no supera en el mejor de los casos el 85%, eso en presencia de lesiones manifiestas. Algunos de estos procedimientos están comercializados (Microtrak®, Syva, USA y SimulFluor® DFA reagent, Chemicon International, USA en formato de IF, y Herpcheck® IDEIA HSV, Du Pont, USA y SureCell® HSV, Kodak, USA, en formato de ELISA). En cualquier caso, si se decide practicar cualesquiera de estos procedimientos, el escobillado enérgico de la base de las lesiones es la muestra óptima puesto que permite arrastrar eficazmente células potencialmente infectadas.

## PCR EN EL DIAGNÓSTICO DEL HERPES GENITAL

Se han descrito numerosos protocolos de amplificación de señal o de diana para la detección de los VHS en muestras genitales, algunos de los cuales han sido comercializados (Real, España y Hybrid capture II, Digene, USA). Los cebadores utilizados habitualmente hibridan con secuencias conservadas de los genes que codifican las glucoproteínas de superficie gD y gB, o las proteínas enzimáticas DNA polimerasa y timidina quinasa. Los formatos cualitativos de PCR anidada y multiplex han sido, hasta hace poco tiempo, los más empleados. En general, la sensibilidad de estos procedimientos excede la del cultivo celular y la de cualquiera de los métodos de detección de antígeno viral. Comoquiera que el cultivo es comúnmente exitoso, el uso de la PCR ha encontrado plena justificación cuando se dispone de muestras en las que cabe esperar cargas virales bajas: úlceras de varios días de evolución y, particularmente, costras, y para detectar la excreción "subclínica" o asintomática de los VHS. Los protocolos publicados no están exentos de problemas; aparte de los falsos positivos, la imposibilidad de amplificar el DNA viral por la presencia de inhibidores en las muestras es quizá el más relevante y hace recomendable el uso de controles internos de amplificación.

El advenimiento de nuevos formatos de PCR, muy especialmente la PCR en “tiempo real” y la PCR isotérmica con amplificación mediante bucles (“loops”), permite aventurar que estos métodos sustituirán al cultivo clásico como prueba de referencia en el diagnóstico del herpes genital. La PCR “en tiempo real” es muy sensible, reproducible y de rápida ejecución, permite cuantificar la carga viral en la muestra -de interés para estimar el riesgo de enfermedad neonatal y evaluar la eficacia del tratamiento-, y tipificar el VHS en una sola reacción; esto último es posible bien a través del análisis de las denominadas curvas de disociación (*melting curves*) -las de VHS-1 y VHS-2 resultan identificables por la existencia de 2 pares de bases de diferencia (*mismatches*) entre los VHS-1 y VHS-2 en la región de unión de los cebadores al DNA viral-, bien mediante secuenciación directa del amplicón, o bien empleando un formato de PCR anidada y múltiple; el mayor inconveniente de la PCR en “tiempo real” es que resulta cara; pero no es el único: la existencia de cepas circulantes con mutaciones puntuales en las regiones de unión del DNA viral a los cebadores de uso habitual y, en ocasiones, el particular contenido en sales de algunos especímenes pueden dificultar la tipificación de los VHS, aunque no su detección.

La PCR isotérmica con amplificación mediante bucles (“loops”) es una prometedora alternativa a la PCR en “tiempo real”: su tiempo de ejecución es menor (1 h, aproximadamente), es más barata (sólo se precisa de un lector turbidimétrico para la detección de los amplicones) y permite, al igual que ésta, la tipificación del VHS, utilizando para ello varios cebadores que hibridan selectivamente con secuencias específicas de tipo presentes en el gen que codifica la glucoproteína gG; pero es menos sensible que la PCR en “tiempo real”. Mediante este método también es posible la cuantificación de la carga viral presente en la muestra.

## LA SEROLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DEL HERPES GENITAL

El papel de los métodos serológicos en el diagnóstico de la infección herpética sintomática es secundario; no obstante, pueden ser útiles en las siguientes situaciones: (i) historia reciente de enfermedad compatible con un herpes genital sin lesiones aparentes, (ii) primoinfección herpética o infección inicial sintomática recientemente adquiridas (hace más de 6 semanas) en que los métodos directos son negativos o inaccesibles y (iii) existencia de lesiones recurrentes de naturaleza presuntamente herpética en que no se puede demostrar la presencia del virus mediante métodos directos. Para el diagnóstico de la primoinfección la demostración de seroconversión de IgGs es paradigmática; no tanto la detección de IgMs, cuya presencia puede asociarse a los episodios de recurrencias. La detección de anticuerpos anti-VHS específicos de tipo es, sin embargo, capital en la identificación de los individuos infectados por los VHS; aunque escapa del propósito de esta revisión, el uso de las pruebas de anticuerpos frente al VHS-2 con fines de cribado podría ser beneficioso en los siguientes colectivos: (i) individuos con elevado riesgo de adquirir ETS y de infectarse por el VIH resueltos a abandonar las prácticas sexuales de riesgo (con objeto de limitar la expansión de la infección herpética), (ii) pacientes infectados por el VIH (los individuos coinfectados precisan de un manejo clínico-terapéutico selectivo), y tal vez también, aunque menos relevante en materia de salud pública, (iii) individuos con pareja infectada por el VHS-2 (para evitar la transmisión) y (iv) gestantes (prevención de la enfermedad neonatal).

Desde mediados de la década de los noventa se dispone de pruebas comercializadas, en los formatos ELISA, *immunodot* e *immunoblot*, que permiten la detección de anticuerpos específicos de tipo frente a los VHS; éstas utilizan como sustrato antigénico las glucoproteínas gG1 (VHS-1) y gG2 (VHS-2), las cuales contienen epítomos tipo-específicos en su extremo aminoterminal; la infección natural por los VHS no suele generar cantidades apreciables de anticuerpos con reactividad gG cruzada.

Existen en el mercado no menos de 10 pruebas de detección de anticuerpos específicos de tipo, la mayoría de las cuales utiliza como antígeno bien la glucoproteína gG2 nativa -purificada mediante cromatografía de afinidad-, o recombinante -expresada en el sistema Baculovirus-, o bien péptidos sintéticos que abarcan la zona que contiene los epítomos tipo-específicos; el uso de algunas de ellas ha sido autorizado por el FDA con fines diagnósticos (ej. ELISA para VHS-2 de HerpeSelect-Focus Technologies, Cypress, Calif-, el inmunoblot VHS tipos 1 y 2 de Focus Technologies y el ELISA POCKit para VHS tipo 2 de Diagnology, Ltd., Belfast, Northern Ireland). La sensibilidad de estas pruebas varía entre un 90-95%, la especificidad media es inferior al 96% y el valor predictivo positivo es insatisfactorio en áreas de baja prevalencia; en consecuencia, no es infrecuente que la confirmación del estatus serológico del paciente requiera el uso de pruebas más complejas, no comercializadas y sólo disponibles en centros especializados: un ELISA de bloqueo con anticuerpos monoclonales específicos de tipo, optimado en el Central Public Health Laboratory de Londres y un *western blot* desarrollado en la Universidad de Washington Seattle que emplea como sustrato antigénico extractos de células infectadas por los VHS-1 y VHS-2; esta última es, en la actualidad, la prueba de referencia.

Conviene tener en consideración distintas situaciones en que las pruebas de detección de anticuerpos anti-VHS-2 pueden resultar falsamente negativas: (i) infección por cepas carentes del gen gG2 (esta proteína es dispensable para el virus), (ii) tratamiento precoz con aciclovir -el efecto negativo del aciclovir sobre el desarrollo de anticuerpos frente a gG2, observado en algunos pacientes, ha sido constatado en varios estudios- e (iii) infección por cepas heterotípicas con variación crítica en la secuencia de la gG.

Existe consenso en considerar que, con objeto de mejorar la fiabilidad de las pruebas de detección de anticuerpos específicos de tipo, será necesario diseñar nuevos ensayos que utilicen otras proteínas en calidad de antígeno; la subunidad grande la ribonucleótido reductasa viral (R1 o ICP10 e ICP6 para los VHS-1 y VHS-2, respectivamente), es un candidato prometedor habida cuenta de que su extremo aminoterminal contiene varios epítomos tipo-específicos.

## **ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD DE LOS VHS A LOS ANTIVIRALES**

La resistencia de los VHS a los antivirales de uso terapéutico o profiláctico de las infecciones herpéticas, el aciclovir, valaciclovir o famciclovir, es rara. Un 1% de los aislados procedentes de individuos inmunocompetentes son resistentes a aciclovir; sin embargo, hasta un 12% de los procedentes de pacientes inmunodeprimidos tratados prolongadamente con aciclovir lo son debido a mutaciones en el gen que codifica la timidina kinasa (TK) viral o en el gen de la DNA polimerasa viral. Considerando lo anterior, y puesto que el uso de antivirales con actividad antiherpética es cada vez más extendido, conviene establecer programas sistemáticos de vigilancia de la sensibilidad de los VHS a los antivirales de uso habitual.

Se dispone de una amplia variedad de pruebas fenotípicas y genotípicas para el análisis de la sensibilidad de los VHS a los antivirales; las primeras son preferibles a las segundas; en este sentido, el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) avala el uso del método de reducción de placas en monocapas de células Vero, MRC-5 o HEL como prueba de referencia para la evaluación de la sensibilidad de los VHS al aciclovir y foscarnet; también al famciclovir y penciclovir, aunque las condiciones de ensayo propuestas para estos antivirales deben ser optimadas; ello con base en la estrecha correlación acreditada entre la respuesta *in vivo* al tratamiento y el resultado del análisis de sensibilidad *in vitro*. Este ensayo es, sin embargo, muy laborioso y caro, su análisis es

relativamente subjetivo y los resultados se obtienen a menudo demasiado tarde para resultar determinantes en el manejo clínico del paciente.

Existen varios métodos fenotípicos alternativos al ensayo de reducción de placas; los más prometedores incorporan a éste inmunoensayos (ej. MISE-test microplate *in situ* ELISA) que permiten cuantificar el nivel de expresión de varias proteínas virales en presencia y ausencia del antiviral, la citometría de flujo (ensayos citofluorométricos), la PCR en “tiempo real”, o el análisis colorimétrico; ejemplo de esta última tendencia es el método denominado ELVIRA (*Enzyme-linked virus inhibitory reporter assay*), basado en el ELVIS y al que se ha hecho referencia anteriormente.

## BIBLIOGRAFÍA

- ASHLEY R, WALD A. Genital herpes: review of the epidemic and potential use of type-specific serology. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:1-8.
- AURELIAN L. Herpes simplex viruses. En: Specter S, Hodinka RL, Young SA (eds). *Clinical Virology Manual*, 3ª ed. Washington DC: ASM Press, 2000; pp 384-409.
- GUERRY SL, BAUER HM, KLAUSNER JD, *ET AL*. Recommendations for the selective use of herpes simplex virus type 2 serological tests. *Clin Infect Dis* 2005; 40:38-45.
- KIMBERLIN DW, ROUSE DJ. Genital herpes. *N Engl J Med* 2004; 350:1970-1977.
- PATEL R. Progress in meeting today`s demands in genital herpes: an overview of current management. *J Infect Dis* 2002; 186 (Supl 1):S47-S56.
- RAMASWAMY M, SMITH M, GERETTI AM. Detection and typing of herpes simplex DNA in genital swabs by real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2005; 126:203-206.
- SLOMKA MJ. Current diagnostic techniques in genital herpes: their role in controlling the epidemic. *Clin Lab* 2000; 11: 591-607.
- STEVENSON J, HYMAS W, HILLYARD D. Effect of sequence polymorphisms on performance of two real-time PCR assays for detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2391-2398.
- STRANSKA R, VAN LOON AM, POLMAN M, SCHUURMAN R. Application of real-time PCR for determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:2943-2947.
- SUGIYAMA H, YOSHIKAWA T, IHIRA M, ENOMOTO Y, KAWANA T, ASANO Y. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. *J Med Virol* 2005; 75:583-587.
- VÁZQUEZ F, OTERO L, JUNQUERA ML, VARELA JA. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:392-411.