

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR LOS VIRUS HERPES SIMPLEX

Juan José Camarena y José Miguel Nogueira
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia.

Los virus *Herpes simplex* (VHS), de los que se han identificado los tipos 1 y 2 (VHS-1 y VHS-2), son microorganismos ubicuos responsables de una amplia variedad de infecciones que afectan a un importante porcentaje de población, con cifras muy elevadas de infectados en la edad adulta. Los VHS producen infecciones latentes con reactivaciones que ocurren como consecuencia de una serie de factores conocidos. Por ejemplo, se sabe que las reactivaciones son más frecuentes en el VHS-2 que en el VHS-1, o que los pacientes inmunodeprimidos las sufren con más frecuencia que el huésped normal.

La prevalencia de la infección varía en función de la edad para cada tipo de VHS. La infección por el VHS-1 aumenta gradualmente desde la infancia, llegando a cifras del 80% en los adultos jóvenes. Por el contrario, y debido a que la infección por el VHS-2 se adquiere típicamente por transmisión sexual, el porcentaje de pacientes seropositivos comienza a incrementarse durante la adolescencia, desde el 15% a más del 50% en edad adulta, en función de una amplia variedad de factores demográficos. Estos datos, considerados como generales en la mayoría de los estudios, no siempre son reproducibles en situaciones concretas. Diversos trabajos realizados en nuestro país ponen en evidencia la importante seroprevalencia de anticuerpos frente a los VHS, con cifras de 80-90% en los adultos jóvenes, y con diferencias significativas entre el VHS-1 y el VHS-2, en función del diferente mecanismo de transmisión y del tipo de individuos a los que afectan. Así, la seroprevalencia de VHS-2 en una comunidad estará determinada por los mecanismos de transmisión, según sea ésta sexual o perinatal. Utilizando técnicas serológicas de enzimoimmunoensayo (EIA) basadas en la glucoproteína gG2 como antígeno, García-Corbeira *et al.* (1999) estudian casi 4000 muestras de población en España comprendida en un intervalo de edad de 5 a 59 años, con una seroprevalencia del 3,6%, sin que se observen diferencias significativas entre grupos de edad, sexo ni área geográfica. Estos resultados difieren completamente de la idea clásica, descrita en la mayoría de los países, de un incremento progresivo de la frecuencia de la infección por el VHS-2 en la adolescencia relacionada con el inicio de la actividad sexual. De acuerdo con esos resultados, el VHS-2 no circularía de manera significativa en la población general de nuestro país, sino que quedaría restringido probablemente a ciertos grupos de riesgo.

En general, el incremento progresivo de la prevalencia de estos virus, así como de las reactivaciones en los inmunodeprimidos, hace que sus infecciones sean un problema clínico cada vez más frecuente. Además, debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas que producen los VHS y a su similitud con otras infecciones mucocutáneas o del sistema nervioso central (SNC) el diagnóstico microbiológico se hace cada vez más necesario.

La infección por los VHS presenta un amplio espectro clínico en función del tipo y estado inmunitario del individuo, variando desde las primoinfecciones asintomáticas, de diagnóstico complicado, a otras de distinta localización y notable gravedad, como las lesiones mucocutáneas locales o generalizadas, la afectación de las mucosas ocular (conjuntivitis, queratitis), bucal (gingivoestomatitis, faringitis) o genital (herpes genital), las infecciones del SNC, la afectación visceral y el herpes neonatal. Esto hace que el planteamiento diagnóstico microbiológico deba realizarse desde premisas iniciales claras, en función del tipo de lesión, características del huésped y estadio evolutivo de la infección en el momento de la obtención de las muestras.

En la actualidad, dentro del espectro clínico causado por los VHS, la afectación del SNC y el herpes genital son quizá los dos cuadros más importantes que requieren del diagnóstico microbiológico. En cuanto a las infecciones del SNC se dividen en tres categorías: i) infecciones neonatales, habitualmente causadas por el VHS-2, relacionadas con la infección genital de la madre y que requieren un diagnóstico rápido y eficaz por su elevada mortalidad, ii) encefalitis, mayoritariamente causadas por el VHS-1 y que presenta una elevada morbilidad y mortalidad, de ahí la necesidad de un diagnóstico rápido que permita instaurar un tratamiento precoz, antiviral, por lo que estarían indicadas alternativas moleculares o serológicas, y iii) meningitis aséptica recurrente (meningitis de Mollaret), principalmente asociada al VHS-2.

El herpes genital es una de las más frecuentes enfermedades de transmisión sexual y está causada en su mayoría por el VHS-2. Los estudios seroepidemiológicos de prevalencia de anticuerpos anti-VHS-2 son especialmente trascendentes para determinar el impacto de esta infección en los grupos de riesgo. Además, la adecuada identificación de los individuos infectados por el VHS-2 es importante para prevenir la transmisión a parejas y neonatos, así como para identificar las infecciones asintomáticas. El herpes genital no diagnosticado constituye claramente uno de los factores más importantes en el mantenimiento de la epidemia. El método más práctico y común para identificar un portador silente del virus es el estudio de anticuerpos específicos de tipo, metodología disponible en la mayoría de los laboratorios.

LA REPUESTA SEROLÓGICA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR LOS VHS

Ante la sospecha de infección por los VHS, es muy importante que el laboratorio tenga claros los objetivos que persigue, adecuando las diferentes técnicas diagnósticas disponibles a las diferentes situaciones clínicas con las que se enfrenta. Esta claridad de objetivos es fundamental para luego interpretar correctamente los resultados obtenidos según cada situación concreta. El diagnóstico indirecto serológico, basado en la determinación de los anticuerpos específicos frente a los VHS, no resulta en general de tanta utilidad como el diagnóstico directo basado en el aislamiento del virus o en la aplicación de metodología molecular. Aún partiendo de esta premisa, no debemos olvidar que, debido al amplio espectro de infecciones por los VHS, vamos a encontrarnos ante casos en los que resulte necesario recurrir a la detección de anticuerpos específicos de

cada tipo de virus, principalmente en el suero o en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente. Esto ocurre sobre todo cuando el aislamiento del virus no resulte posible, en situaciones de negatividad del diagnóstico directo o en aquellos casos (v.g. encefalitis) en los que la toma de una muestra adecuada suponga un riesgo no justificable. En estos casos el diagnóstico serológico aparece como una alternativa a utilizar o, incluso en ocasiones, el único modo de establecer la infección.

La investigación de los anticuerpos anti-VHS se realiza básicamente a partir del suero del paciente aunque, en ocasiones, se pueden detectar de diversos líquidos biológicos, entre los que destaca el LCR en los casos de afectación neurológica. Es importante señalar, para poder detectar una hipotética seroconversión, la necesidad de obtener dos muestras de suero, al inicio de los síntomas y a los 15-21 días siguientes.

La ausencia de anticuerpos indica que el individuo no ha sido infectado por los VHS. Tras la infección primaria se produce un incremento rápido de los anticuerpos IgM, seguido posteriormente de un incremento de los IgG. Los de clase IgM, aunque pueden desaparecer al cabo de 3-6 meses, presentan perfiles muy variados para cada individuo, pudiendo su persistencia indicar que la replicación viral continúa. En las infecciones recurrentes pueden persistir o reaparecer los anticuerpos IgM, lo que ocurre también tras las infecciones secundarias herpéticas graves como la encefalitis, aunque su negatividad no excluye el diagnóstico. Las IgG persistirán elevadas prácticamente de por vida, por lo que su detección no podrá utilizarse como signo de infección activa. Tan sólo implican que el individuo ha sido infectado por el VHS-1, VHS-2 o ambos. También suponen que es portador del VHS en los ganglios sensitivos y que el virus puede reactivarse intermitentemente. Para documentar el estado inmunitario de un individuo frente a los VHS se han descrito numerosos métodos serológicos, entre los que los más eficaces y disponibles comercialmente se basan en técnicas de EIA. Sin embargo, la elevada reactividad cruzada entre el VHS-1 y el VHS-2 cuando se utilizan antígenos crudos hará imposible diferenciar entre una infección pasada por uno u otro virus. La necesidad de solucionar este problema desde el punto de vista del manejo práctico en las diferentes situaciones clínicas ha hecho que, en los últimos años, se hayan desarrollado métodos basados en antígenos específicos de tipo. Ambos virus poseen aproximadamente un 83% de homología en su secuencia nucleotídica, lo que se traduce en una marcada reactividad serológica cruzada. El descubrimiento en los años 80 de la glucoproteína G (gG), con diferencias en la antigenicidad según el tipo de virus, permitió, en cierto modo, la resolución del problema, facilitando el desarrollo de pruebas específicas de tipo dirigidas a la detección de anticuerpos IgG e IgM.

TÉCNICAS DISPONIBLES EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LOS VHS

La necesidad de identificar los dos tipos de VHS ha justificado el desarrollo de métodos serológicos, en particular de enzoinmunoensayo, con el objetivo principal de diferenciar los anticuerpos específicos de cada tipo. Sin embargo, en la actualidad existen todavía pruebas disponibles comercialmente que utilizan antígenos comunes y cuyo interés diagnóstico es, lógicamente, muy limitado. Esto se traduce en la dificultad de interpretar los resultados serológicos, como muy bien se observa en el Control de Calidad que acompaña a esta revisión. La ineficacia de los métodos de ELISA basados en un antígeno crudo obtenido tras el lisado de las células infectadas es una consecuencia de la elevada concentración de antígenos comunes de ambos VHS. Los ensayos para desarrollar pruebas basadas en antígenos específicos de tipo se han centrado ante todo en las glucoproteínas de la envoltura, como la gG, que se comportan como buenos inmunógenos, además de tener importantes funciones biológicas.

Aunque se han utilizado numerosas técnicas en el estudio serológico de la infección por los VHS, la fijación de complemento, de utilidad hasta épocas recientes, la IFI y actualmente las técnicas de EIA, o de inmunotransferencia son las más comunes. La fijación de complemento con un antígeno soluble de VHS ha ido perdiendo protagonismo, debido a su moderada sensibilidad y a su incapacidad para diferenciar entre los tipos de virus y de inmunoglobulinas. Las técnicas de ELISA son las más utilizadas actualmente, al estar además disponibles comercialmente. Permiten la detección de anticuerpos IgG o IgM y la diferenciación, no sin problemas, entre los dos tipos. La comercialización de este tipo de pruebas ha ampliado su disponibilidad a muchos laboratorios. Actualmente deben incluirse como las técnicas de elección para el estudio serológico de los VHS.

La técnica de inmunotransferencia o *western-blot* (WB), aunque descrita hace más de diez años, se utiliza en la diferenciación de los dos tipos de VHS como método de referencia, con los problemas ya conocidos de coste, tiempo y laboriosidad. Es una técnica sensible y específica que permite detectar anticuerpos IgG en suero y LCR en donde se estudia la reactividad frente a las proteínas específicas del virus, por lo que resulta de utilidad en el diagnóstico de la encefalitis y en los estudios de diferenciación entre ambos tipos de virus. Aunque se considera en la actualidad como el patrón de referencia para el diagnóstico diferencial de los dos VHS, su complejidad técnica y la demora en su realización la inhabilitan como prueba de cribado. Una alternativa comercial que podría aplicarse en algunos laboratorios es el *immunoblotting* en tiras (RIBA), válido para casos concretos, aunque no utilizable para estudios amplios de seroprevalencia.

En resumen, las pruebas basadas en antígenos específicos de VHS-1 y VHS-2 disponibles comercialmente en la actualidad se basan en:

- a) Pruebas de EIA que utilizan como antígeno la glucoproteína gG. Se han desarrollado diversos métodos comerciales para la determinación de anticuerpos específicos de tipo, según utilicen como antígeno la glucoproteína G del VHS-2 (gG-2) o del VHS-1 (gG-1). La diferencia entre los diversos sistemas existentes en el mercado se basan principalmente en el modo de obtención del antígeno para recubrir la placa. Su utilidad se comenta al analizar algunos estudios realizados recientemente.
- b) Técnica de *immunoblotting* en tira o RIBA que incluye bandas tipo común de proteína recombinante D (gD), un péptido dominante específico del VHS-1 (gB-1 o gG-1) y un antígeno recombinante (gG-2) específico del VHS-2. Es útil para la detección precoz de la respuesta serológica y la diferenciación entre infección por VHS-1, VHS-2 o por ambos. Su aplicación está restringida al análisis de casos concretos, no siendo recomendable en estudios de seroprevalencia.

INDICACIONES E INTERPRETACIÓN DE LA SEROLOGÍA DE LOS VHS

Aunque en la mayor parte de las ocasiones el diagnóstico de las infecciones por los VHS es clínico, existen situaciones que justifican el estudio microbiológico. Sería, por ejemplo, el caso del herpes neonatal, el diagnóstico etiológico de la encefalitis, las infecciones generalizadas en individuos inmunodeprimidos, en ocasiones con formas de presentación clínica poco habitual, y el diagnóstico etiológico del herpes genital en el contexto del diagnóstico diferencial de los agentes causales de úlceras genitales.

Un resultado serológico (detección de IgG) negativo indicará la ausencia de un contacto previo con el VHS o la falta de una respuesta inmunitaria debida a alteraciones en su sistema inmune, o porque la infección está en su fase inicial. La presencia de anticuerpos totales, por el contrario, será evidencia de una infección herpética en fecha no precisada. La ausencia de seroconversión, o una prueba de IgM negativa indicará una infección previa no activa en el momento del estudio. La presencia de IgM será reflejo de una infección en evolución, aunque no siempre será sinónimo de infección primaria, ya que es posible detectar este tipo de anticuerpos en algunas recurrencias. Así, la detección de IgM no parece mejorar la especificidad del diagnóstico serológico en los pacientes con signos clínicos de infección por VHS, y no debe utilizarse esta prueba para diferenciar la infección primaria de las reactivaciones. Tampoco la cuantificación del título de anticuerpos IgG es útil para este propósito, puesto que las recurrencias no siempre se acompañan de una elevación del título y, por el contrario, éste puede aumentar en ausencia de reactivación viral. En resumen, los métodos serológicos no deberían ser utilizados como norma general para el diagnóstico de las infecciones recurrentes por los VHS.

Papel de la serología en el diagnóstico de las infecciones herpéticas del SNC

La serología no ocupa un lugar preferente entre las técnicas diagnósticas de las infecciones herpéticas del SNC al ser un diagnóstico indirecto cuya positividad tan sólo sugiere la posibilidad de una infección activa y cuyos resultados son, por lo general, retrospectivos. En la actualidad las técnicas de PCR son las recomendables.

La detección de anticuerpos en LCR no siempre es sinónimo de una infección local, ya que el origen de éstos puede ser sérico y haber pasado las barreras correspondientes. Así, en las infecciones de SNC se utilizan los índices de IgG totales y específicos en LCR y suero, junto con el índice de albúmina (que nos indicará una alteración de barrera hematoencefálica) para así poder demostrar la producción de anticuerpos intratecales. Se considera que una relación entre anticuerpos específicos locales y anticuerpos séricos igual o mayor de 2 indica una infección localizada. En consecuencia, la detección local de IgG anti-VHS en el LCR puede ser utilizada para documentar una encefalitis herpética en algunos pacientes aunque, en ocasiones, se requieren 2-4 semanas para demostrar los casos positivos. Así pues, los métodos serológicos no resultan útiles para el diagnóstico precoz que permita establecer un tratamiento antivírico rápido que condicionará, a su vez, el pronóstico del paciente. Quizá la detección de los anticuerpos de la clase IgM pudiera solventar esta limitación, aunque el valor de esta prueba no está claramente establecido por el momento.

Papel de la serología en el diagnóstico del herpes genital

El diagnóstico del herpes genital resulta fundamental en el manejo de estos pacientes y en el desarrollo de estrategias para prevenir la transmisión a las parejas y a los neonatos. La detección de anticuerpos permite el diagnóstico de la infección cuando otros métodos virológicos como el cultivo, la detección antigénica o las técnicas de PCR son impracticables o dan resultados negativos.

En estas situaciones, la detección serológica de los anticuerpos específicos anti-VHS-2 podría solucionar el problema. Sin embargo hay que tener en cuenta algunas condiciones. Si se utilizan sistemas ELISA con antígeno común, el problema más importante será demostrar la presencia de anticuerpos frente al VHS-2 en pacientes con una infección previa por el VHS-1. Por el contrario, las pruebas específicas de tipo permiten la identificación de los portadores asintomáticos del VHS-2 en pacientes con o sin anticuerpos preexistentes frente al VHS-1. Estos pueden también proporcionar información en los pacientes sintomáticos cuando el diagnóstico directo no es posible. Hay que recordar, sin embargo, que hasta un 10-15% de las infecciones genitales pueden estar causadas por el VHS-1.

UTILIDAD DE LA SEROLOGÍA ANALIZADA EN ALGUNOS ESTUDIOS RECIENTES

La utilidad de las técnicas de ELISA actualmente disponibles, basadas en la gG recombinante expresada en baculovirus o purificada de cultivos infectados, ha sido estudiada recientemente por diversos autores. Eis-Hübinger *et al.* (1999) compara un ELISA común de tipo, con antígeno de sobrenadante de células infectadas, frente a métodos ELISA basados en gG: antígeno gG2 recombinante en baculovirus, gG2 purificado por afinidad con anticuerpos monoclonales y gG2 purificado con lectina. Estos nuevos sistemas de ELISA resultan útiles en la detección específica de la IgG anti-VHS-2, mejorando el serodiagnóstico de la infección por los VHS aunque, en ocasiones, requieren de una cuidadosa interpretación en función del tipo de infección del paciente.

Schmid *et al.* (1999) comparan la utilidad de un ELISA comercial con gG1 expresada en baculovirus o gG2 purificada con lectinas, frente a un *immunoblot* comercial en tiras de nitrocelulosa impregnada de gG1 expresada en baculovirus, gG2, gD2 y vp41 en diferentes bandas y un método *western blot*. Aplican estos métodos en el seguimiento temporal de un grupo de pacientes, comprobando cambios en el estado serológico individual (pacientes previamente positivos se volvían negativos a lo largo del tiempo) y un grado de coincidencia sólo moderado entre los diferentes métodos, a pesar de que todos ellos habían mostrado buenos resultados durante la validación individual realizada con estudios de corte. Las discrepancias eran más

