

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD “NÉSTOR MORALES
VILLAZÓN”
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y BIOMEDICAS



TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE MASTER EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y
BIOMÉDICAS

MENCION: MICROBIOLOGIA

Caracterización Viral y epidemiología de Virus Herpes Simplex aislados de
Pacientes con Infección Genital que acuden al Centro Piloto-La Paz
(Abril 2003 – Agosto 2004)

POSTULANTE: Noemí Celina Monzón Huanca

ASESOR: Dra. Aleida Nina C.

La Paz – Bolivia

2005

TABLA DE CONTENIDO

	Página.
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCION	6
II. MARCO TEORICO	7
II.1. ANTECEDENTES	7
II.2. ASPECTOS GENERALES	8
II.3. VIRUS HERPES SIMPLEX. ESTRUCTURA	9
II.4. REPLICACIÓN	11
II.5. PATOGENIA	14
II.6. LATENCIA Y REACTIVACION	16
II.7. INMUNIDAD	18
II.8. EPIDEMIOLOGIA	19
II.9. CUADRO CLINICO	21
II.10. TRANSMISION DE HERPES GENITAL	23
II.11. CLASIFICACION DE HERPES GENITAL	24
II.11.A. Eliminación viral asintomático	25
II.11.B. Herpes genital recurrente	26
II.11.C. Herpes genital atípico	28
II.12. EMBARAZO E INFECCION POR VHS	28
II.13. VIRUS HERPES SIMPLEX Y SIDA	29
II.14. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	30
II.15. TRATAMIENTO	33
II.15.A. Antivirales	34
II.15.B. Mecanismo de acción del aciclovir	37
II.15.C. Mecanismos de resistencia	38
III. FLUJOGRAMA DE ESTUDIO	40
III.1. MODELO TEORICO	40

III.2. MODELO LABORATORIAL	41
IV. JUSTIFICACIÓN	43
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
VI. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	45
VI.1. OBJETIVOS	45
VI.1.A. Objetivo general	45
VI.1.B. Objetivos específicos	45
VI.2. DISEÑO DE ESTUDIO	46
VI.3. TAMAÑO MUESTRAL	46
VI.4. TIPO DE VARIABLES	47
VI.5. POBLACIÓN	47
VI.6. UNIDAD DE ANÁLISIS	47
VI.7. CONSENTIMIENTO INFORMADO	47
VII. METODOLOGIA	48
VII.1. CRITERIOS DE INCLUSION	48
VII.2. CRITERIOS DE EXCLUSION	48
VII.3. TIPO DE MUESTREO	49
VII.4. RECOLECCION DE DATOS	49
VII.5. VALIDACION DE DATOS	49
VII.6. ANALISIS DE DATOS	50
VII.7. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	50
VIII. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS	52
VIII.1. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO	52
VIII.2. REACTIVOS	53
VIII.3. PROCEDIMIENTO	54
VIII.3.A. Toma de muestra	54
VIII.3.B. Procesamiento de las muestras en laboratorio	54
VIII.3.B. a) Inmunofluorescencia indirecta	54
VIII.3.B. b) Cultivo Celular	56
IX. PRUEBA DE SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> AL ACICLOVIR	57
IX. 1. TITULACION VIRAL	57

IX. 2. REDUCCION DEL EFECTO CITOPATICO AL 50%	58
X. RESULTADOS	59
XI. DISCUSION	69
XII. CONCLUSIONES	75
XIII. RECOMENDACIONES	76
XIV. BIBLIOGRAFIA	77

RESUMEN

La infección genital herpética, es una infección de transmisión sexual (ITS), que representa un problema de salud pública a nivel mundial, estimándose que cerca de un tercio de la población mundial estaría infectada por este virus; su alta frecuencia asociada a las complicaciones que genera, como ser: la capacidad de persistencia y reactivación del virus, el riesgo de transmisión vertical de la madre al hijo, el riesgo de transmisión desde portadores asintomáticos a individuos sanos, su asociación con procesos neoplásicos y la facilitación de la transmisión sexual de otros virus, hacen necesario su estudio y diagnóstico virológico.

El herpes genital en Bolivia se constituye en una patología de la cual no existen datos sobre prevalencia e incidencia, debido a muchas causas, principalmente, el subdiagnóstico, que obedece a la falta de información tanto en los pacientes como en la comunidad médica, a cerca de esta infección de transmisión sexual, la falta de notificación regular, falta de estudios previos respecto a este tema y la carencia de recursos necesarios para su diagnóstico.

El objetivo del presente estudio fue determinar las características virológicas y epidemiológicas de los virus herpes simplex en trabajadores sexuales comerciales y población general, con diagnóstico clínico de herpes genital que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz, entre abril de 2003 a agosto de 2004.

Se obtuvieron, mediante impregnación directa en portaobjetos y por hisopado en Medio de transporte viral, un total de 85 muestras de lesiones genitales procedentes de pacientes mujeres y varones. Las muestras se procesaron mediante aislamiento viral en cultivo de células VERO y dos variantes de prueba rápida por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Los aislados virales obtenidos se tipificaron antigénicamente por IFI, con anticuerpos monoclonales tipo específicos y

posteriormente, se determinó su sensibilidad *in vitro* al aciclovir mediante Inhibición del efecto citopático 50% (IC₅₀)

El 29,4% de los casos diagnosticados clínicamente como herpes genital, fueron positivos para VHS en cultivo celular. La IFI, en impregnación directa y en sedimento celular, se puede considerar como una alternativa de diagnóstico rápido, al cultivo celular, principalmente en aquellos casos donde los días de evolución de la lesión no sobrepase los 4 días y se observen lesiones vesiculares.

En Trabajadores Sexuales Comerciales (TSC) la frecuencia de aislamiento de VHS fue de 38%, de la cual el mayor porcentaje (87,5%) corresponde al sexo femenino; y en la población general (PG) fue del 27%, correspondiendo un 82% al sexo masculino, sin embargo, cabe señalar que la distribución de la población estudiada en ambos sexos no es comparable, por lo que se sugiere un próximo estudio, respecto a este punto.

El nivel de instrucción en ambos grupos poblacionales correspondió con mayor frecuencia al nivel medio, 75% en TSC y 47% en la PG.

La edad promedio de los pacientes fue de 30 y 24 años en PG y TSC, respectivamente.

En la PG con diagnóstico de laboratorio positivo, el 29% refirió una sola pareja sexual y el 71% 2 o más parejas sexuales (promedio de 5 parejas sexuales) y en los casos negativos el promedio de parejas sexuales fue de 2 (t de Student $p < 0,005$, estadísticamente significativo). En el grupo de TSC positivos para VHS, el promedio de parejas sexuales fue de 17. Al realizar la prueba de t de Student se obtuvo un valor de $p < 0,005$, estadísticamente significativo.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al comparar la edad de inicio de actividad sexual (valor $p > 0.792$).

De los 25 casos positivos para herpes genital, 14 (56%) corresponden a recurrencias de las cuales 4 pacientes recibieron tratamientos con aciclovir en sus recurrencias previas y 10 pacientes recibieron aciclovir por primera vez luego de la confirmación diagnóstica de laboratorio proporcionado por este estudio; y los restantes 11 (44%) corresponden a primoinfección.

El mayor porcentaje de aislamiento se obtuvo a partir de lesiones vesiculares (55%) en comparación a lesiones ulcerosas, (chi cuadrado $p < 0.007$), y en los casos negativos, el 88% de las muestras fueron obtenidas a partir de úlceras en comparación a lesiones vesiculares, (chi cuadrado $p < 0.01$).

El 100% de los aislados virales corresponden al VHS tipo 2 y fueron sensibles al aciclovir, con un valor promedio de $IC_{50} = 2,2 \text{ ug/ml}$.

La implantación del diagnóstico virológico ha generado una valiosa información del agente etiológico y de las características epidemiológicas de la población afectada por herpes genital, al constituirse, tanto en herramienta disponible y de apoyo al médico clínico y de beneficio para el paciente, así como generador de información epidemiológica para el Sistema Nacional de Salud de Bolivia (SNIS) y la futura inclusión de esta patología dentro de la vigilancia epidemiológica para su control y prevención.

ABSTRACT

Genital infection by Herpes Simplex Virus (HSV) is an infection of sexual transmission (IST), it is a public health problem in all the world, approximately one third of the population in the world would be affected with this virus; its high frequency associated to the complications that it generate like: the capacity of persistence and reactivation of virus, the risk of vertical transmission from mother to son, the risk of transmission from an asymptomatic carrier to healthy people, its association with cancer and the facilitation of the sexual transmission the others virus, make necessary its research and viral diagnostic in our country.

The goal of this research was to determinate the virological and epidemiological characteristics of the HSV in sexual workers and general population, with a clinical diagnostic of genital herpes in the Pilot Centre of La Paz city since April of 2003 until August of 2004.

Eighty five (85) samples of genital lesions from women and men patients, obtained by direct impregnation in slide and by using swab in transport viral medium. The samples were inoculated viral isolation in cell culture (VERO) and two variants of fast test by Indirect Immunofluorescence (IFI). Were made the viral isolates were antigenically typified by IFI, with specific monoclonal antibodies against HSV-1 and HSV-2 and subsequently, it determined its sensibility *in vitro* to aciclovir by using Cytotoxic effect Inhibition 50% (**IC₅₀**).

The 29.4% of the cases clinically diagnosed like genital herpes were positives for HSV in cell culture. IFI in direct impregnation and in cellular sediment, it can be considerate as an alternative diagnostic to the cell culture; principally in those cases that the days of evolution of the damage is not over the four days and it can show vesicular damage and also if requires a fast diagnostic.

In commercial sexual workers (CSW) the frequency of isolation of HSV was 38% and 27% in the general population (GP) In the GP its could observed a greater frequency in the male population, with 82% positives and in CSW the greater frequency was in female population with 87.5%.

The level of education in both groups of the population belonged with major frequency to medium level, 75% en CSW and 47% in GP.

The overage age of the patients was of the 30 and 24 ages in GP and CSW, respectively.

In GP with diagnostic of positive laboratory, 29% referred an only sexual couple and the 71% two or more sexual couples (overage in 5 sexual couples) and in negative cases the overage of sexual couples was 2 (t of student $p < 0,005$, statistically significant). In the group of CSW positives for HSV the overage of sexual couples was 17, t student $p < 0,005$ statistically significant.

There is no difference statistically significant between the two groups at the age of beginning of the sexual activity (value $p > 0,792$).

The most overage of isolation it obtained from vesicular damage (55%), (chi square $p < 0.007$), and in the negatives, 88% of the samples were obtained in ulcers (chi square $p < 0.01$). The 100% of the viral isolates belongs to HSV type 2 and were sensitive to acyclovir, with an overage value of $IC_{50} = 2,2$ ug/ml.

The introduction of the virological diagnostic has given an important information about etiological agent and the epidemiological characteristics of the population affected by genital herpes, it becomes an available tool and support to the clinical doctor and it benefits to the patient as generator of epidemiological information for Health National System of Bolivia (SNIS) and the future inclusion of this pathology in surveillance epidemiological for its control and prevention.

I. INTRODUCCIÓN

El herpes genital es una infección de transmisión sexual (ITS), causada por los Virus Herpes Simplex (VHS), de los que se han identificado dos tipos: el virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1), asociado mayoritariamente a lesiones faciales y bucales; y el virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), asociado principalmente a lesiones genitales. (1,2). De hecho, el VHS-2 es en la actualidad, uno de los agentes transmitidos por vía sexual más frecuentes en el mundo, así se refiere que en los EEUU se reportan anualmente 500 mil a 1 millón de casos nuevos y 40 millones de casos recurrentes de herpes genital (3), y aún cuando la infección genital también puede ser ocasionada por el VHS-1, la historia natural de uno u otro tipo viral es diferente, sin embargo, aproximadamente un 15% se encuentra asociada al VHS-1, lo cual se ha relacionado con la actividad sexual orogenital (1,2,4).

La infección genital herpética reviste especial importancia, sobre todo por las complicaciones asociadas a ella:

- Capacidad de persistencia y múltiples recurrencias en pacientes inmunocompetentes y más aún en pacientes inmunodeprimidos (individuos con SIDA, personas que estén recibiendo quimioterapia, radioterapia prolongada o que estén tomando dosis elevadas de cortisona), pudiendo estas personas, además sufrir infecciones en varios órganos como: queratitis herpética del ojo, infección persistente de la piel y membranas mucosas de la nariz, boca y garganta, esofagitis herpética, hepatitis herpética, encefalitis (5, 6,7).
- Transmisión vertical de la infección de VHS de la madre al hijo durante el embarazo, parto o posparto, que puede conducir al bebé a una meningitis herpética, a una viremia herpética, infección crónica en la piel o incluso a la muerte (3,5).

- La facilitación de transmisión sexual de otros agentes infecciosos asociados con procesos neoplásicos como el cáncer de cuello uterino, especialmente cuando está presente en combinación con el virus del papiloma humano (HPV) (5, 6, 7).

En Bolivia el herpes genital está incluido dentro del síndrome de úlceras genitales sin diagnóstico de laboratorio, de ahí que no existen datos precisos de la frecuencia de herpes genital, ni estudios previos, de esta infección de transmisión sexual.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. ANTECEDENTES

Los estudios epidemiológicos demuestran que todos los virus de la familia *Herpesviridae* son extraordinariamente ubicuos y están ampliamente extendidos en la población general (8).

La infección genital herpética en Bolivia constituye una patología cuya prevalencia no se conoce exactamente, debido a muchas causas como la falta de notificación regular, falta de estudios previos respecto a este tema y a la carencia de recursos necesarios para su diagnóstico.

Es así que, el suministro de información sobre esta infección de transmisión sexual es reducida y las infecciones genitales herpéticas están incluidas dentro del Síndrome de úlceras genitales que anualmente se reportan en el Sistema Nacional de Información de Salud de Bolivia (SNIS), que revelan los siguientes datos como casos sospechosos de úlcera genital correspondiente al período comprendido de enero a diciembre de 2002 en la ciudad de La Paz.

**CASOS SOSPECHOSOS REPORTADOS
DE ÚLCERA GENITAL
La Paz Ámbito Urbano
Año 2002 (enero a diciembre)**

	Menor a 1 año	1 - 4 años	5 - 14 años	15 - 59 años	60 años y más	TOTAL
ITS hombre con úlcera genital	0	0	2	641	14	657
ITS mujer con úlcera genital	0	2	28	1342	17	1389
TOTAL hombres y mujeres con úlcera genital	0	2	30	1983	31	2046

Fuente: Sistema Nacional de Información en Salud SNIS. La Paz – Bolivia (9)

II.2. ASPECTOS GENERALES

El virus herpes simplex (VHS) pertenece la familia *Herpetoviridae* y los humanos se pueden infectar por cualquiera de los ocho virus que se incluyen dentro de esta familia: (6, 8, 10)

FAMILIA HERPESVIRIDAE

NOMBRE	SUBFAMILIA	TAMAÑO DEL GENOMA (PARES DE BASES)
Herpes simplex tipo 1 (VHS-1)	<i>ALFAHERPESVIRINAE</i>	152.260
Herpes simplex tipo 2 (VHS-2)	<i>ALFAHERPESVIRINAE</i>	154.000 (aprox.)
Varicela zóster (VVZ) (VHH 3)	<i>ALFAHERPESVIRINAE</i>	124.884
Epstein Barr (VEB) (VHH 4)	<i>BETAHERPESVIRINAE</i>	229.354
Citomegalovirus (CMV) (VHH 5)	<i>GAMMAHERPESVIRINAE</i>	172.282
Virus herpes 6 humano (VHH 6)	-----	160.000 – 170.000
Virus herpes 7 humano (VHH 7)	-----	140.000 – 150.000
Virus herpes 8 humano (VHH 8)	<i>GAMMAHERPESVIRINAE</i>	-----

La familia *Herpesviridae*, constituye un grupo de virus ADN grandes que comparten una morfología común, el modo básico de replicación, la capacidad para establecer infecciones latentes/recurrentes y la inmunidad mediada por células para controlar la infección.

Los herpes virus pueden originar infecciones líticas, persistentes, latentes/recurrentes e inmortalización de las células infectadas (virus de Epstein-Bar) (8).

Los herpes virus están ampliamente diseminados y sus infecciones son comunes. Aunque suelen causar enfermedad benigna pueden provocar morbilidad y mortalidad significativas sobre todo en individuos inmunocomprometidos. Sin embargo, estos virus codifican enzimas que actúan como dianas para los agentes antivíricos y varios de estos fármacos tienen utilidad terapéutica (8).

II.3. VIRUS HERPES SIMPLEX. ESTRUCTURA

El virus herpes simplex fue el primer herpesvirus humano identificado. El nombre herpes deriva de la palabra griega *Herpeto* que significa reptar, serpentear. Las “calenturas” (herpes febril) fueron descritas en la antigüedad y su etiología vírica se demostró en 1.919 (8).

El VHS son virus grandes, encapsulados que contienen un ADN bicatenario, con manto o envoltura. El virión mide aproximadamente 150 nm de diámetro, el núcleo de ADN está rodeado por una cápside icosadeltaédrica que contiene 162 capsómeros, los cuales son estructuras en forma de prisma con una zona hueca central. La cápside está rodeada a su vez por una envoltura que contiene glucoproteínas. El espacio entre la envoltura y la cápside se conoce como tegumento y contiene proteínas y enzimas víricas que ayudan a iniciar la replicación (8,10).

El genoma del VHS es suficientemente grande para codificar alrededor de 80 proteínas, de las cuales alrededor de la mitad se necesitan para la replicación viral, las otras facilitan la interacción del virus con distintas células hospedadoras y la respuesta inmunitaria. 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.

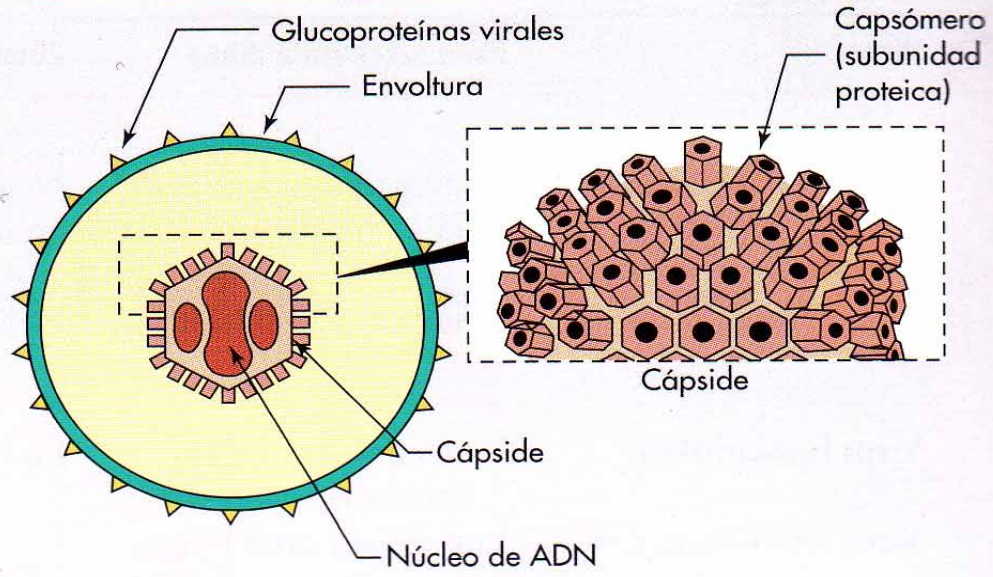
La ribonucleótido reductasa, convierte los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos y la timidin cinasa fosforila los desoxirribonucleótidos a fin de suministrar sustratos para replicación del genoma vírico. Los sustratos específicos de estas enzimas y de la ADN polimerasa, difieren en forma significativa de los de sus análogos celulares y por tanto representan buenas dianas 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), proteínas de fusión (gB), estructurales de escape inmune (gC gE gI) y con otras funciones. Por ejemplo la gC se une al componente C3 del sistema del complemento y hace que descienda su concentración en suero.

La porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) se une al complejo gE/gI camuflando así al virus y a las células infectadas por él. Estas acciones reducen la efectividad antiviral de los anticuerpos (8,10).

Sobre la base de sus antígenos se reconocen dos serotipos virales, el VHS tipo 1 (VHS-1) y el VHS tipo 2 (VHS-2), que comparten aproximadamente un 50% de homología genética, determinantes antigénicos, tropismo tisular y síntomas de enfermedad, y dentro de ellos se ha establecido la existencia de numerosas cepas o variantes genómicas (5,8), ambos son capaces de persistir en forma latente en el individuo infectado a nivel del ganglio sensitivo de la raíz dorsal correspondiente al dermatoma afectado. Es probable que ambos provengan de un mismo virus parental

Estructura esquemática del grupo de los virus herpes



expresados en células similares, los dos virus se unen a estructuras diferentes (11).

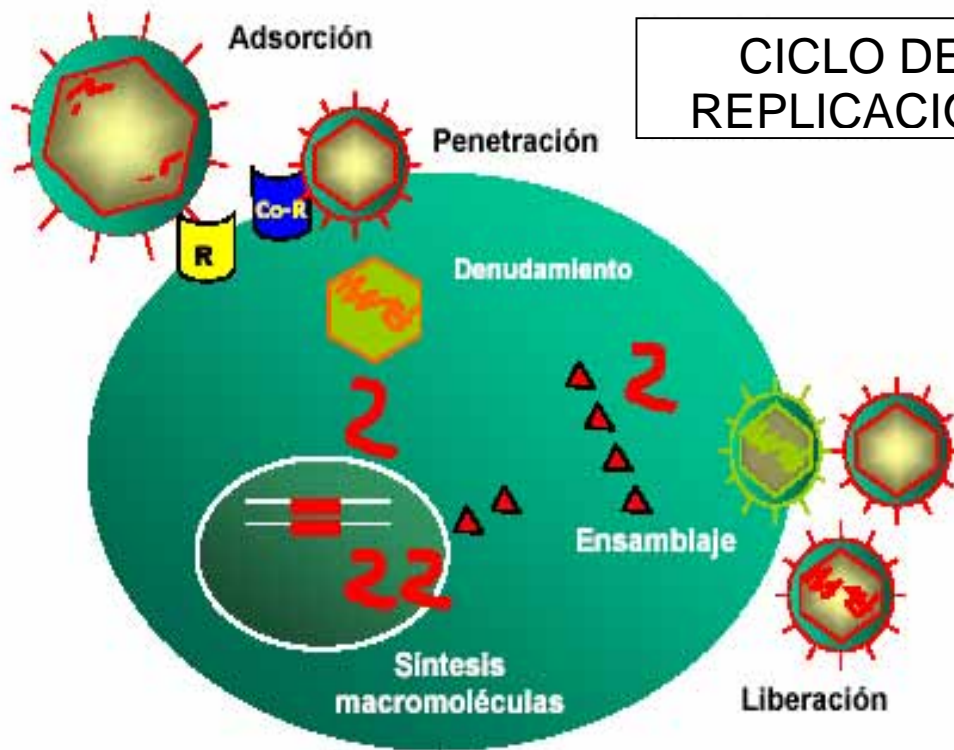
- Penetración, como resultado de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y subsiguiente ingreso de la nucleocápside que migra hacia el poro nuclear (11).
- Descapsidación, con liberación del ADN viral en el nucleoplasma: el acceso y preservación del ADN viral se encuentra facilitado por una concomitante inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares (11).
- Transcripción del genoma viral, que ocurre a través de una ARN-polimerasa II de origen celular, pero con participación de factores virales en todos los estadios de la replicación. El ADN viral consiste en dos secuencias: L (large) y S (small), que son segmentos que pueden invertirse uno con respecto al otro, es decir que el ADN consistiría en 4 fragmentos, cada uno exhibiendo una diferente orientación de las regiones L y S. La transcripción y replicación tiene lugar en el núcleo y la síntesis de proteínas ocurre en el citoplasma. Los herpes son los únicos virus con genoma ADN que no imponen un control rígido a la transcripción, tal es el caso de las regiones tardías del genoma que son expresadas en ausencia de síntesis de ADN viral. Sin embargo, la generación de proteínas virales es coordinadamente regulada y secuencialmente ordenada en un proceso en cascada, que resulta de los diferentes procesamientos de los transcritos virales. La biosíntesis ocurre en 3 fases y los ARNm procesados durante esos 3 períodos corresponden a 3 clases de polipéptidos: temprano alfa (proteínas precoces inmediatas o proteínas de unión de ADN), importantes para regular la transcripción de los genes tempranos beta (proteínas precoces beta), consistentes en más enzimas y factores de transcripción, entre los que se incluyen la ADN polimerasa y tardíos gamma (proteínas tardías gamma), principalmente proteínas estructurales. Son regiones no contiguas del genoma viral las que

han de originar los ARNm que serán traducidos durante cada una de las 3 fases. En la inicial, los genes alfa son los primeros en ser expresados, generando 5 polipéptidos de los cuales uno es el requerido para la síntesis del subsiguiente grupo de polipéptidos, el beta. La producción de estos polipéptidos que corresponden entre otros a enzimas tales como ADNasa, timidin-cinasa y ADN Polimerasa, implica la cesación de síntesis de los alfa. La tercera fase depende de la duplicación del ADN viral y corresponde a transcritos del 50% del genoma que codifican los polipéptidos gamma, en su mayor parte proteínas estructurales que han de migrar al núcleo para conformar las cápsides o bien insertarse tanto en la membrana nuclear como la plasmática, reemplazando a las proteínas celulares. Otra característica del herpes virus, es que codifica un gran número de enzimas implicadas en la síntesis de su ADN, la que comienza cuando cesa la producción de polipéptido beta. Aparentemente, sólo una pequeña porción del ADN parental sería replicada, a través de mecanismos que incluyen circularización del ADN viral e iniciación de la replicación en uno o dos sitios (12).

- Armado, que tiene lugar en el núcleo y está dado por un ADN viral que se emplaza en el interior de una cápside preformada.
- Maduración, representada por una nucleocápside que adquiere envoltura a través de su brotación por la membrana nuclear.
- Liberación, a partir de la migración de viriones acumulados en el espacio perinuclear y que han de egresar al espacio extracelular, sea por fagocitosis reversa o por disrupción de la membrana plasmática (12).

En el caso del VHS, la célula productivamente infectada no sobrevive. Desde el comienzo del ciclo reproductivo viral, ocurren alteraciones estructurales y bioquímicas que conducen a la lisis celular.

CICLO DE REPLICACIÓN



transmisión del virus. Otras diferencias entre los dos tipos incluyen especificidad de receptor, características de crecimiento y antigenicidad. El VHS-2 tiene mayor tendencia a producir viremia y se asocia con síntomas sistémicos de tipo gripal (8,10).

El VHS puede causar infección lítica de la mayoría de las células, infección persistente de los linfocitos y macrófagos, e infección latente de las neuronas. La citólisis, se debe en general a inhibición inducida por el virus de la síntesis de macromoléculas celulares, degradación del ADN de la célula huésped, permeabilidad de la membrana, alteración del cito esqueleto y senescencia de la célula. Se producen cambios de la estructura nuclear y marginación de la cromatina, junto con aparición de cuerpos de inclusión intranucleares acidófilos tipo A de Cowdry. Muchas cepas de VHS inician también la formación de sincitios (8).

El virus inicia la infección de las membranas mucosas o penetra a través de fisuras en la piel. El VHS suele causar una infección localizada que puede ser inaparente o provocar lesiones vesiculares, el virus se multiplica en las células de la base de la lesión, y el líquido vesicular contiene viriones infecciosos. La lesión está causada por una combinación de patología vírica e inmunopatología.

En general se resuelve sin dejar cicatriz. El virus se disemina hacia las células adyacentes y a las neuronas que inervan la zona. Después de la infección de la neurona, la nucleocápside es transportada hasta el núcleo celular e inicia una infección latente (8).

Además de las vesículas herpéticas en genitales características en pacientes con un primer episodio de herpes genital, también con frecuencia se presentan síntomas neurológicos (por ejemplo, cefalea, rigidez de cuello y fotofobia) (13).

II.6. LATENCIA Y REACTIVACIÓN

A través de un ciclo viral que incluye primoinfección, latencia y reactivación el genoma viral induce una infección persistente, de acuerdo a una sucesión de etapas que se cumplen en un área anatómica circunscripta, la que está integrada por una neurona ganglionar, su prolongación axonal con las células circundantes y el segmento de epitelio innervado por esa neurona. En forma consecutiva al contacto inicial con herpes simplex, ocurre una replicación en el sitio de inoculación y con ellas se alcanza un título infectivo que posibilita la penetración de las partículas virales hasta alcanzar las terminaciones nerviosas presentes en las capas profundas del epitelio. Desde aquí en adelante, el herpes simplex necesita de un pasaje rápido y resguardado, y lo logra por intermedio del axón de las células de Schwann que circundan ese axón y de las células satélites que rodean al soma neuronal (8).

Una vez ingresado el ADN viral al núcleo de la neurona, se establece el estado de latencia, definido por un genoma viral que persiste intracelularmente sin expresarse o lo hace en forma parcial. A la vez latencia implica que ese genoma viral pueda ser activado a su total expresión.

No es posible aislar virus infeccioso a partir de homogenatos ganglionares aunque sí pueden recuperarse cuando las neuronas son cocultivadas con células permisivas (11). Recurriendo a esos procedimientos de rescate, es que se ha establecido la presencia del VHS-1 en ganglio del trigémino y del VHS-2 en ganglios sacros. El estado molecular del VHS latente, se describe como estático o de replicación bloqueada, es decir una condición que explica la ausencia de proteínas detectables y la consiguiente evasión a la acción de las defensas inmunes del huésped (12).

Se conoce que ese genoma persiste como ADN circular y extracromosomal y que carece de secuencias terminales repetitivas invertidas. Sin embargo, existe una limitada expresión de por lo menos un gen, y los correspondientes transcriptos son

marcadores específicos de latencia, como esos LATs (latency associated transcripts) solo han sido evidenciados en el núcleo de aproximadamente el 1% de neuronas latentemente infectadas, esa limitación de la expresión genómica a tan baja proporción de células justificaría la estricta localización de las infecciones recurrentes. Cabe señalar que hasta ahora ninguna proteína codificada por los herpes simplex-LATs, ha podido ser detectada. De todos modos, se supone que si bien esos LATs no estarían involucrados en el establecimiento o mantenimiento de la latencia, si estarían implicados en el facilitamiento del proceso de reactivación (12,14).

Cuando llega a superarse el bloqueo que condiciona la latencia, se establece una infección productiva. Es a través de una replicación restringida que no está asociada a lesión neuronal, ni a expresión de antígenos virales en la superficie neuronal que se sintetiza una progenie viral destinada a ser exportada al epitelio, donde sí provoca lesiones celulares evidenciadas como erupciones vesiculosas, habitualmente circunscriptas a límites cutáneo mucosos. De la infección productiva epitelial resulta una acumulación de partículas virales en líquidos vesiculares, facilitándose en consecuencia la transmisión interhumana por contacto (15).

Una gran variedad de estímulos pueden inducir cambios en el estado fisiológico de la neurona y así reactivar una infección latente, según diversos mecanismos:

1. Afección primaria de la neurona ganglionar (injuria neural, neurectomía, alteraciones en el entorno celular).
2. Acción sobre el epitelio innervado (sol, luz ultravioleta, lesiones cutáneas)
3. Intervención por vía sistémica, a través de hormonas (premenstruo, tratamiento con corticosteroides), o de condicionamientos emocionales (ansiedad, depresión, estrés) (10, 12,15).

El estrés puede tener un efecto doble: 1.favorecer la replicación del virus en el tejido nervioso y 2. Deprimir transitoriamente la inmunidad mediada por células. (13,15) Sin

embargo, las infecciones recurrentes suelen ser menos graves, más localizadas y de menor duración que los episodios primarios, a causa de la existencia de las respuestas inmunitarias de memoria (8).

II.7. INMUNIDAD

Durante la fase de primoinfección, las defensas inmunes circunscriben al virus a la unidad anatómica “epitelio-nervio-neurona”. Pero una vez que el herpes simplex establece la latencia ya no resulta accesible al sistema inmune y su reactivación ocurre pese a la presencia de anticuerpos humorales específicos (8,12).

El control y la resolución de la infección por VHS requieren participación de la inmunidad humoral y celular. Los anticuerpos dirigidos contra las glucoproteínas víricas neutralizan el virus extracelular, lo que limita su diseminación. Los anticuerpos contra el VHS-1 protegen también frente a posibles ataques futuros por otras cepas del mismo virus, y hasta cierto punto contra las infecciones por VHS-2, y viceversa. Sin embargo, el virus puede escapar a la neutralización y la eliminación por los anticuerpos, mediante diseminación directa célula a célula e infección latente de las neuronas (8).

Además el virión y las células infectadas por el virus expresan receptores de anticuerpos (Fc) y de complemento, que debilitan estas defensas humorales. En ausencia de una inmunidad funcional mediada por células, la infección por VHS es mas grave y puede extenderse hasta órganos vitales y el cerebro, en consecuencia la respuesta inmune mediada por células es esencial para el control y la resolución de las infecciones por VHS (8,10).

Durante la infección primaria, el interferón y los linfocitos citolíticos naturales (células asesinas naturales), limitan la progresión de la infección. Tras la infección para

eliminar las células infectadas y curar una enfermedad en curso es necesaria una hipersensibilidad retardada asociada a los linfocitos T colaboradores de tipo 1 (T-helper 1, TH1) y la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (12).

En la infección primaria por VHS se produce un incremento rápido de los anticuerpos tipo IgM seguido posteriormente de un incremento de los IgG. Los de clase IgM aunque suelen desaparecer al cabo de 3 a 6 meses, presentan perfiles muy variados para cada individuo pudiendo su persistencia indicar que la replicación viral continua (9).

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 solo implican que el individuo ha sido infectado por el VHS-1 o VHS-2 o ambos, también suponen que es portador del VHS en los ganglios sensitivos y que el virus puede reactivarse intermitentemente (12,16).

Los anticuerpos antivirales sólo indican infección latente o activa, ya que estando presente en la mayoría de los enfermos antes de la recurrencia, no varían posteriormente durante un tratamiento prolongado con aciclovir (17). Por otra parte, una vez que se ha establecido latencia, la condición de anticuerpos no participa en la probabilidad de reactivación viral o desarrollo de recurrencias (18).

II.8. EPIDEMIOLOGÍA

La frecuencia de herpes genital aumenta en todo el mundo y el virus herpes simplex es la causa más común de úlceras genitales. Una medida de la infección de herpes genital es la seroprevalencia de anticuerpos en contra del virus herpes simplex tipo 2

(VHS-2) en la población, sin embargo esto no refleja el número creciente de casos de herpes genital ocasionado por virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1) (3).

En 1994, el International Herpes Management Forum (IHMF) resumió los resultados de 9 países controlados en los años previos, la población estudiada incluía donantes de sangre, parejas de mujeres embarazadas y varones en clínicas de esterilidad, resultando la seroprevalencia de VHS tipo 2 más alta en África (30 a 40%), seguido de EEUU (13 a 40%) y en Europa (7 a 16%) (3,19).

Según reportes a nivel mundial la seropositividad para el 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 78%-80% para las prostitutas a nivel mundial (4,8).

Sin embargo, la prevalencia de marcadores serológicos de infección por el VHS-2 varía de acuerdo con el tipo de población estudiada, en trabajadoras sexuales de diversos países las seroprevalencias son consistentemente mayores a las observadas en grupos femeninos que acuden a planificación familiar o a clínicas de detección de enfermedades venéreas. En la ciudad de México por ejemplo, la prevalencia de marcadores serológicos de infección por VHS-2, se ha encontrado de 60,8% a 65,1% en trabajadoras sexuales, y de 18,1% en asistentes a consulta ginecológica (1).

Así, en Inglaterra son seropositivos al VHS-2 el 17% de varones heterosexuales, 27% de homosexuales varones y 25% de mujeres que asisten a una clínica de ITS, comparados con 10% de donadores de sangre femeninas y 3% masculinos (3).

En Zaire la seroprevalencia entre trabajadoras sexuales, es de 95% en individuos VIH positivos y 75% en VIH negativos (3).

Al igual que en la seroprevalencia del VHS-2 existe una variación geográfica en el número de casos de herpes genital por VHS-1 , así en algunos sitios de Reino Unido VHS-1 causa 50% de los primeros episodios de herpes genital (3).

En Chile, según un estudio de seroprevalencia en pacientes clínicamente diagnosticados con herpes genital el año 2003, se obtuvo una prevalencia del 43% (20).

II.9. CUADRO CLÍNICO

Tanto el VHS-1 como el VHS-2 pueden ser causantes del herpes genital, dependiendo de las prácticas sexuales de los individuos. La mayoría de las infecciones genitales primarias son asintomáticas. Cuando existen las lesiones, la presentación clínica es una vesícula clara sobre una base eritematosa “una gota de rocío en un pétalo de rosa” que se caracteriza por diseminación de estas vesículas, que suelen ser dolorosas y pueden ser en genitales internos o externos seguido por ulceración y costras con síntomas locales intensos y prolongados así como hipertermia, cefalea y malestar general en algunos pacientes (8).

Las lesiones típicas de los hombres, se localizan en el glande o el cuerpo del pene y a veces en la uretra; 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 mucoide. Este primer episodio de herpes genital es con frecuencia más prolongado y grave en mujeres que en varones (11). Fotos 1 y 2.



El episodio completo en la primoinfección, dura dos o tres semanas sin tratamiento. En contraste las recurrencias por lo general duran menos tiempo de 5 a 7 días y consisten en una sola lesión o pequeño grupo de lesiones en genitales externos (18).

A continuación se detallan las complicaciones relacionadas al herpes genital: (13)

COMPLICACIONES LOCALES AGUDAS DEL HERPES GENITAL

- Infección bacteriana secundaria
- Fimosis y parafimosis
- Adhesiones labiales
- Radiculomielopatía sacra
 - Parestesia
 - Retención urinaria
 - Constipación

II.10. TRANSMISIÓN DEL HERPES GENITAL

La transmisión de herpes genital puede darse por dos tipos:

a) Directa

- La primoinfección genital se adquiere fundamentalmente por contacto sexual y este contacto puede ser de genital a genital, boca a genital, genital a anal o buco anal. La infección puede presentarse cuando la pareja fuente tiene recurrencia clínica o con mayor importancia cuando están diseminando el virus asintómicamente (18).

b) Indirecta

- Re infecciones exógenas, ya sea por auto-inoculación desde otra zona previamente infectada, como infección de los ojos por auto-inoculación o por infección a partir de otro huésped (5).
- Transmisión vertical de la madre al hijo:

1. Transplacentaria

2. Durante el paso del bebé por el canal vaginal que puede ocurrir tanto por una primoinfección cercana al parto o también por la reactivación de una infección latente materna, constituyéndose en un factor de alto riesgo para el recién nacido originando un herpes neonatal cuya mortalidad sin tratamiento puede superar el 80% en los casos de infección diseminada (3, 21, 22).

II.11. CLASIFICACIÓN DEL HERPES GENITAL.

La clasificación del herpes genital se puede observar en el siguiente cuadro: (13)

CLASIFICACIÓN DEL HERPES GENITAL

A) ASINTOMÁTICO.-

Infección por VHS asintomático

Infección por VHS sin síntomas clínicos, pero con evidencia sexológica o virológica de infección.

B) CLÍNICO.-

Herpes Genital Primario

Primer episodio de herpes genital en individuos sin anticuerpos VHS-1 o VHS-2.

Herpes Genital no Primario	Primer episodio de herpes genital en individuos con anticuerpos VHS-1.
Herpes Genital Recurrente	Recurrencia o reactivación de herpes genital.
Primer episodio de herpes genital	Primera presentación clínica de herpes genital (puede ser herpes genital primario, no primario o recurrente).
Herpes Genital “atípico”	Herpes genital con síntomas que no se reconocen típicos de herpes.

II.11.A. ELIMINACIÓN VIRAL ASINTOMÁTICO.

La evidencia para la importancia de infección no aparente, viene de estudios que documentan la eliminación viral asintomática, o detección de cambios celulares en citología cervical sugestivos de VHS. La eliminación viral no aparente se presenta en dos situaciones: en el primer grupo, los pacientes con herpes genital clínico eliminan el virus asintomáticamente de vez en cuando, los estudios en mujeres con herpes recurrente han mostrado que VHS puede aislarse de 4 a 14% de ellas cuando están asintomáticas y la transmisión de pareja sexual infectada a no infectada por lo general ocurre entre recurrencias clínicas. El segundo grupo de paciente son los que nunca han tenido herpes genital sintomático, pero eliminan virus. La diseminación viral de este tipo se ha demostrado tanto en varones como en mujeres, y en genitales internos y externos (18).

Un estudio efectuado en la Universidad de Washington, evaluó la eliminación asintomático de VHS en 306 mujeres, y se estableció que la eliminación viral

asintomático, se presentó con más frecuencia durante los primeros 3 meses después del herpes genital primario y fue más común en aquellos pacientes que presentaron infección primaria por VHS tipo 2 y que esta se incrementó en fechas cercanas a los periodos sintomáticos, estos estudios además sugieren que el tratamiento antiviral supresivo no limita la eliminación viral asintomático, es decir un tratamiento con aciclovir a largo plazo (dosis de 200 mg cuatro veces al día durante 6 meses), reduce la eliminación sintomática, pero no la asintomática (18).

II.11.B. HERPES GENITAL RECURRENTE

En algunas circunstancias clínicas, las vesículas herpéticas son vistas más comúnmente en las recurrencias de herpes genital que durante la primera aparición o se observan brotes recurrentes cuando las úlceras están cicatrizando. En forma común, las recurrencias son menos severas que la infección primaria en el herpes genital "clásico". Sin embargo, muchos pacientes se presentan con un primer episodio de herpes genital, el cual es una recurrencia, y en estos casos los brotes subsecuentes no serán menos severos (13).

Las infecciones por VHS-2 recurren más temprano y con mayor frecuencia que las debidas a VHS-1, y es interesante saber que las infecciones orales por VHS-2 recurren con menor frecuencia que las de VHS-1 indicando que ambos virus han desarrollado cierto grado de especificidad de lugar (18).

Sin embargo, las infecciones herpéticas recurrentes se presentan aunque el suero tenga niveles altos de anticuerpos neutralizantes antivirales. Este hallazgo ha llevado a postular que la recurrencia se asocie a un defecto en la inmunidad celular (8).

La frecuencia de recurrencias en varones y mujeres parece ser similar, pero las características de estas son diferentes. En varones, las recurrencias duran más y

consisten en más lesiones que en mujeres, pero las mujeres tienen síntomas más graves que los varones (18).

En general su duración no sobrepasa los 10 días excretándose partículas virales por aproximadamente 2 a 5 días y en baja concentración.

Un estudio hecho en Chile demuestra que ambos tipos virales VHS-1 y VHS-2 pueden originar herpes genital pero con distinta frecuencia, las infecciones genitales causadas por VHS-2 recurren aproximadamente en un 65% mientras que las originadas por VHS-1 solo lo hacen en un 20% (2).

Las características clínicas del herpes genital recurrente se detallan en a continuación: (13)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL HERPES GENITAL RECURRENTE

FACTORES PREDISPONENTES:

- Sistémicos: estrés, fatiga, menstruación
- Locales: trauma, coito

SÍNTOMAS PRODRÓMICOS:

- Neuralgia en los dermatomas sacros
- Sensación local de hormigueo, prurito
- En ocasiones, síntomas sistémicos

SIGNOS:

- Generalmente localizados y unilaterales
- Extragenitales, formación de lesiones nuevas y linfadenitis, con menos frecuencia que en la infección primaria.

II.11.C. HERPES GENITAL “ATÍPICO”

Las manifestaciones “atípicas” de herpes genital en mujeres, se presentan comúnmente e incluyen alteraciones epiteliales de tipo fisuras, forúnculos, excoriaciones y eritema vulvar no específico, más sensación de hormigueo, dolor y prurito, no son comunes síntomas neurológicos (13).

Los signos “atípicos” en varón incluyen, fisura lineal de prepucio y manchas rojas en glánde. Las lesiones extragenitales se presentan comúnmente en 16% de pacientes con herpes genital primario, 8% con herpes genital no primario y en 4% de casos de herpes genital recurrente. Las lesiones extragenitales por lo general afectan glúteos, ingle o pierna y son más frecuentes en mujeres que en varones (13).

La infección por candida, diabetes o infección por VIH predisponen a un herpes genital “atípico” (13).

II.12. EMBARAZO E INFECCIÓN POR VHS.

La infección del recién nacido puede ocurrir durante el embarazo por transmisión transplacentaria, por infección genital primaria de la madre, por pasaje del feto por el canal de parto infectado o por contacto con secreciones no genitales infectados en período perinatal y neonatal (11,21,22).

Algunos estudios han demostrado que sólo 28% de mujeres que transmiten VHS-2 a sus hijos tiene antecedentes de herpes genital, constituyéndose el mayor riesgo de transmisión vertical de madre a recién nacido, cuando la madre adquiere infección primaria cerca de la fecha del parto (3) y no así cuando corresponden a recurrencias

genitales, debido a la existencia de anticuerpos maternos neutralizantes, los que se traspasan de la madre al hijo y que de algún modo juegan un rol protector (21).

Existe un severo retardo del crecimiento fetal intrauterino, en mujeres con primoinfección por VHS durante el embarazo. La infección materna primaria antes de las 20 semanas de la gestación se asocia con aborto espontáneo en alrededor del 25% de las mujeres infectadas.

La infección del recién nacido por VHS, es una enfermedad devastadora generalmente mortal, causada la mayoría de las veces por el VHS-2, por la falta de una respuesta inmune en el recién nacido, el VHS puede diseminarse hasta el hígado, pulmón y otros órganos como el sistema nervioso central (11). Pudiendo prevenirse evitando el parto y realizando una cesárea en el momento del nacimiento (22).

II.13. VIRUS HERPES SIMPLEX Y SIDA.

Cuando se ve desde la perspectiva de la taxonomía viral, parece no haber relación entre el virus de la inmunodeficiencia humana y miembros de la familia *Herpesviridae*. Sin embargo, hay múltiples formas en que estos virus pueden potencialmente interactuar, cuando se ve desde el punto de vista de células individuales en el cuerpo humano. De este modo, una vez que el VIH ha dañado el sistema inmunológico celular, los virus herpes latentes pueden reactivarse y causar enfermedad oportunista por su propio derecho. En contraste, los virus herpes interactúan potencialmente con el VIH a nivel celular o molecular para acelerar la velocidad en la que el VIH provoca inmunodeficiencia; llamándose a esto relación de cofactor (6).

Las características que comparten el VIH y el VHS también incluyen la influencia psicológica y social de la infección. Los estudios han mostrado que las respuestas

emocionales a un diagnóstico de herpes genital incluyen temor de rechazo, baja autoestima, ira, culpabilidad y depresión (23).

En pacientes con inmunidad subyacente normal, los virus herpes en forma característica se reactivan para causar enfermedad cuando el paciente no es 100% saludable. Por lo tanto no es sorprendente ver que estos virus causan el mismo tipo de enfermedad, una vez que el VIH ha debilitado al huésped. Estas enfermedades son formas más extensas y más graves que aquellas ocasionadas en pacientes sin infección por VIH, o son condiciones diferentes debido a su frecuencia y presentación (6, 22,23).

II.14. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Para el diagnóstico de herpes genital se pueden emplear las siguientes técnicas de laboratorio:

- Citología/histología.-

La prueba de Tzanc ha sido usada para examinar las células obtenidas de la base de lesiones herpéticas. Las células se extienden sobre un porta se fijan y se tiñen con los colorantes de Wright o Giemsa. Los sincitios, el “balonamiento” del citoplasma y las inclusiones intranucleares tipo A de Cowdry son características de la infección por VHS o VVZ (Virus Varicela Zoster). El examen citológico es sugestivo pero no concluyente. Se puede establecer con rapidez la presencia de VHS mediante demostración de antígenos (inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa) o ADN del virus en una biopsia o extensión de Tzanc (hibridación in situ) (8).

- Serología.

Serología para anticuerpos de tipo IgM específicos, en caso de infección activa, con replicación viral y lesiones vesiculares visibles, desaparecen al cabo de 3 a 6 meses.

Serología para anticuerpos de tipo IgG específicos, que persistirán elevadas por toda la vida, que indica que un individuo has sido infectado.

Los procedimientos serológicos sólo tienen utilidad para el diagnóstico de infección primaria por VHS y para estudios epidemiológicos. La serología no es útil para diagnosticar la enfermedad recurrente puesto que no se suele acompañar de aumento significativo de los títulos de anticuerpos (8). Para ello se pueden utilizar diferentes técnicas como ELISA, reacción de neutralización, enzimoimmunoanálisis indirecto, test de aglutinación, Western Blot.

- Aislamiento del virus en cultivo celular.

El aislamiento viral en cultivo celular es la técnica diagnóstica de referencia para demostrar la infección por VHS, las tasas más altas de recuperación se obtienen por orden de frecuencia en muestras de lesiones vesiculares, lesiones pustulosas, úlceras y lesiones costrosas. Las muestras se recogen mediante aspiración del líquido de la lesión o con una torunda de algodón y después se inoculan directamente en cultivos de células (24,25).

El VHS produce efecto citopático (ECP), al cabo de uno a tres días en células HeLa, HEP-2, VERO, fibroblastos embrionarios humanos o células de riñón de conejo. El ECP del VHS comienza con granulación citoplásmica, posteriormente las células aumentan de tamaño y aparecen balonadas. Las células grandes se redondean se separan de la monocapa y después mueren. Algunos aislamientos inducen fusión de

células vecinas lo que da lugar a elementos gigantes multinucleados (sincitios) (2,8, 24, 25).

- Detección del genoma viral

Otra forma de demostrar la presencia de infección por VHS es la detección del genoma viral, mediante técnicas de biología molecular como ser la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), mediante la cuál pequeñas cantidades de ADN viral pueden ser amplificadas enzimáticamente. La PCR es altamente sensible y específica incluso superando en ocasiones al aislamiento viral en cultivo celular (26, 27,28).

- Tipificación viral.

La tipificación de los aislados de VHS se puede realizar mediante técnicas bioquímicas, biológicas o inmunológicas. Los patrones obtenidos con endonucleasas 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 VHS que permiten detectar y diferenciar entre VHS-1 y VHS-2 (8,29).

La siguiente tabla indica las diferentes pruebas diagnósticas que pueden utilizarse en diferentes momentos del curso de la enfermedad: (13)

PRESENTACIÓN	PRUEBAS DE LABORATORIO ADECUADAS
- Lesiones vesiculares tempranas	Cultivo o detección antigénica*
- Lesiones cicatrizadas tardías	Cultivo**
- Alto riesgo subclínico	Serología específica del tipo (si se dispone de ellas por ejemplo Western blot)
- Síntomas "atípicos"	Cultivo, detección antigénica, o (en pruebas para Investigación) Reacción en cadena para la polimerasa

*Solo si no se requiere prueba de sensibilidad al aciclovir y darán resultados positivos si se toma muestra los primeros 7 a 10 días del episodio inicial, o durante las primeras 72 horas del episodio recurrente de herpes genital.

** Más difícil obtener resultados de cultivo positivo debido a menos virus.

II.15. TRATAMIENTO.

El aciclovir es la droga de elección para el tratamiento del herpes genital sobre todo en pacientes inmunocomprometidos en los cuales la enfermedad es severa y a menudo fatal, pero en los que ha logrado inducir una marcada recuperación. El tratamiento ha demostrado efectividad en la supresión de las recurrencias, aceleración de la resolución de las lesiones y reducción del dolor.

A pesar de ello el aciclovir no modifica la latencia, es decir el efecto de la droga está en relación a su efecto antiviral directo, sin que se puedan atribuir a modificaciones en la respuesta inmune y su efecto persiste sólo mientras se mantiene su administración. Esto plantea la conveniencia de prolongar el tratamiento indefinidamente, considerando los beneficios versus los costos, la severidad de los ataques, la sensibilidad de los virus y la presencia de inmunodeficiencia (8).

La dosis empleada en casos de primoinfección es de 200mg, 5 veces al día, disminuye casi a la mitad la duración del dolor, la sintomatología y los tiempos de excreción viral. El tratamiento del episodio inicial con aciclovir, sin embargo, no modifica la naturaleza crónica o recurrente de la enfermedad (30).

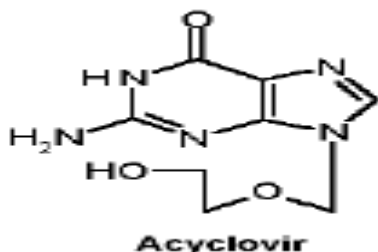
En caso de frecuentes recurrencias se hace un tratamiento de sostén con dosis de 400 mg 2 veces por día durante 3 a 6 meses, observándose una marcada disminución de las recurrencias y su severidad.

Este fármaco es relativamente atóxico ya que se activa únicamente en las células infectadas y se puede emplear con fines profilácticos.

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 (8).

II.15.A. ANTIVIRALES.

Los antivirales más utilizados para el tratamiento de herpes genital son el aciclovir y foscarnet, sin embargo existen muchos más agrupados de la siguiente manera:(30,31)



CLASIFICACIÓN DE ANTIVIRALES	
Análogos de nucleósidos y nucleótidos	Aciclovir, arabinósido de adenosina (vidarabina Ara A), cidofovir, sorivudina, fanciclovir, ganciclovir, idoxuridina, penciclovir, triflutimidina, valaciclovir.
Análogos de los pirofosfatos	Foscarnet
Interferones	Polipéptidos: interferón alfa 2a, 2b, n1 y n2.

La mayor parte de los antivirales (análogos de los nucleósidos y foscarnet), actúan inhibiendo la síntesis del ADN viral (inhibiendo la ADN polimerasa y/o incorporándose a la cadena ADN e impidiendo su elongación).

El fosfonoformato (foscarnet) es un inhibidor de la polimerasa del DNA. Su actividad contra los virus herpes no requiere fosforilación previa por la enzima timidin-cinasa lo que le confiere actividad contra cepas timidina-deficientes.

Los interferones naturales son glicoproteínas que tienen actividad antiviral, se postula que inducen enzimas celulares que interfieren con la síntesis de proteínas virales. Las formulaciones comerciales se obtienen de bacterias por medio de la técnica de DNA-recombinado. Existen 3 tipos de interferones: alfa, beta y gamma, actualmente solo es utilizado el interferón alfa, su mecanismo de acción es la unión de modo reversible a los receptores de la superficie celular donde activa a las enzimas citoplásmicas que interfieren con la lectura del mRNA y la síntesis proteica.

Los análogos de los nucleósidos y nucleótidos para ser activos tienen que fosforilarse (incorporar 2 a 3 moléculas de fosfato) en el interior de las células

infectadas. En el caso del aciclovir y penciclovir, la incorporación de la primera molécula de fosfato la efectúa la timidin cinasa, una enzima viral codificada por los VHS y VZV, por lo que el fármaco se acumula de forma selectiva en las células infectadas por el virus y ello explica su escasa toxicidad. Para el caso del ganciclovir, la incorporación de la primera molécula de fosfato la cataliza una fosfotransferasa codificada por el CMV. La incorporación de los otros dos fosfatos, la catalizan cinasas celulares (11,32).

El arabinósido de adenina - vidarabina (Ara A), está aprobado también para tratamiento de la infección por VHS, aunque es menos específico y por tanto con mayor riesgo de efectos indeseables y en la práctica clínica muestra muy poca eficacia contra cepas de VHS o de VZV resistentes al aciclovir (12,30).

El fanciclovir, es un análogo de la guanosina y pro-fármaco del penciclovir (estructuralmente similar al aciclovir). Una vez absorbido se transforma rápidamente en penciclovir en el hígado y el intestino. Su mayor utilidad está en el tratamiento de infecciones herpéticas recurrentes y en la supresión de infecciones herpéticas crónicas recurrentes.

El cidofovir, es un monofosfato (análogo de nucleótido) que al convertirse en bifosfato muestra actividad contra los VHS tipo 1 y 2, VZV, EBV y CMV.

La idoxouridina, es un análogo de la timidina que inhibe las enzimas que actúan en la síntesis del DNA y que compite con la timidina por la incorporación al DNA viral y celular.

La trifluridina y el aciclovir han sustituido a la idoxouridina como fármacos tópicos para la queratitis herpética (30).

II.15.B. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ACICLOVIR

El aciclovir químicamente es el 9-2 hydroxietioximetil guanina, cuya acción es inhibir la síntesis del DNA viral, para esto el aciclovir debe ser activado por fosforilación, incorporando tres moléculas de fosfato en el interior de las células infectadas. Este proceso de fosforilación es catalizado por una enzima viral, la timidin-cinasa codificada por el VHS, es la responsable para la conversión inicial, a monofosfato del aciclovir. Subsecuentemente la incorporación de los otros fosfatos ocurre bajo el mando de cinasas celulares (24,25).

Este proceso de fosforilación permite la acumulación selectiva de los fármacos dentro de las células infectadas, lo cual reduce la toxicidad (22). Esta activación específica, producen una selectiva captación del aciclovir en las células infectadas considerando que no hay ninguna conversión significativa del aciclovir monofosfato en las células no infectadas (32).

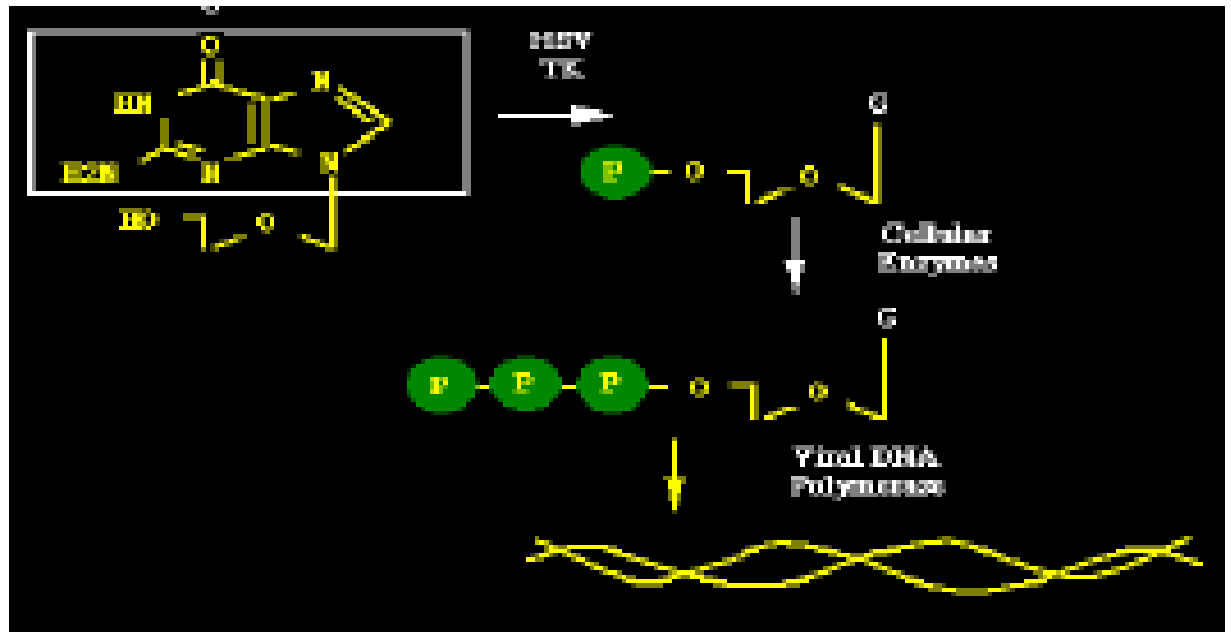
El trifosfato de aciclovir tiene una mayor afinidad por el DNA polimerasa viral, que el sustrato natural que es la desoxiguanosina trifosfato, entonces se compite por la enzima y se produce la incorporación preferencial dentro de la cadena de replicación del ADN.

La terminación de la cadena nucleosídica ocurre por la falta de un grupo 3' hidroxilo, capaz de aceptar el nucleótido entrante, además la incorporación del aciclovir no puede cortarse por exonucleasas de la célula (33).

La ADN polimerasa viral también se limita irreversiblemente al aciclovir dando lugar este complejo, a una inactivación de la misma.

Las consecuencias de este selectivo mecanismo de acción son dos: primero, la actividad se restringe a estos virus que codifican una timidin-cinasa específicos

QUESTION



ANSWER

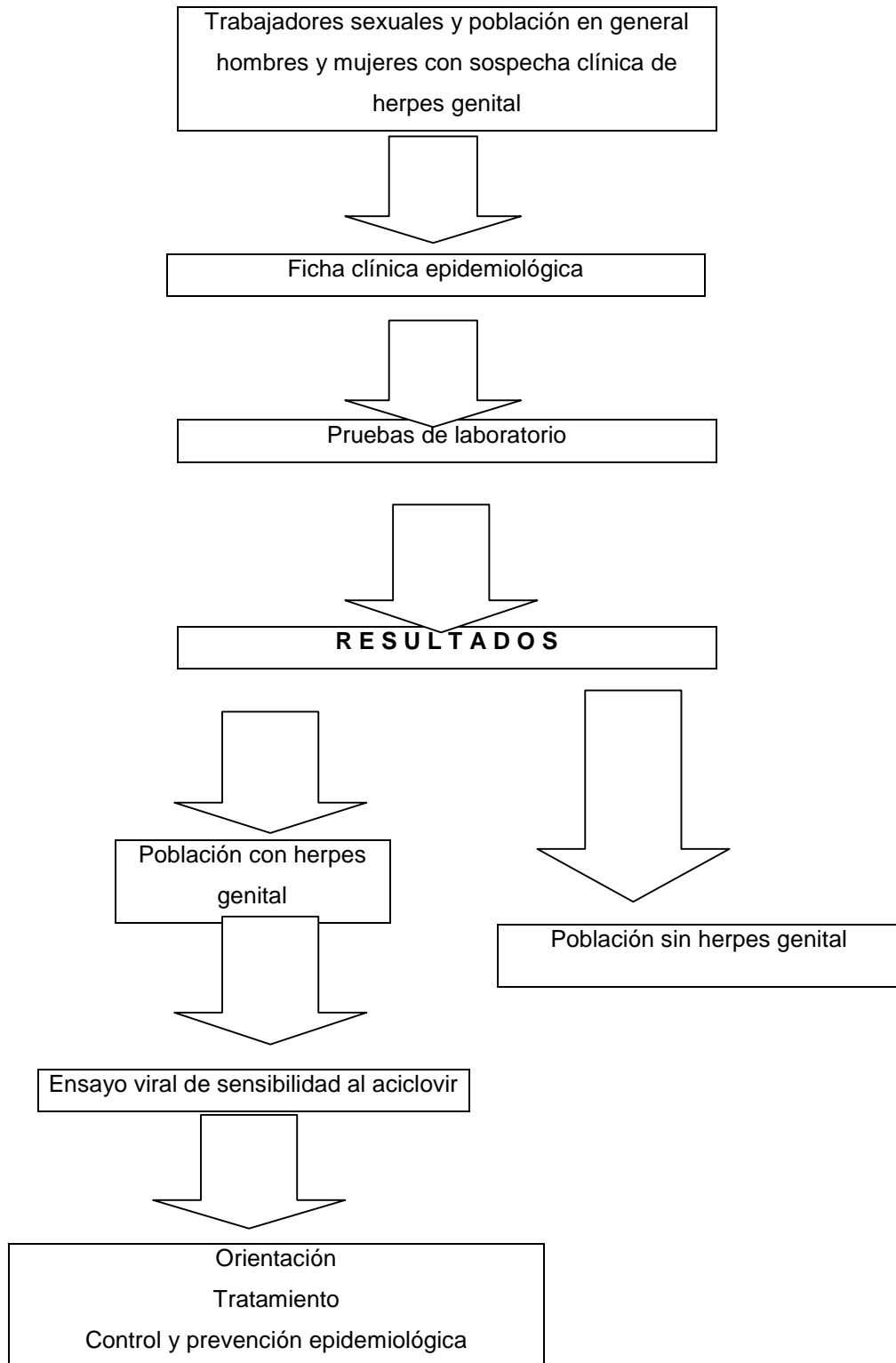
potenciales sustratos, generando cepas TK alteradas (fenotipo TK^A) y c) mutaciones en el gen DNA pol, determinan resistencia en cepas de VHS-TK⁺ (25).

Una alteración en la ADN polimerasa viral es también la causa de la resistencia al foscarnet (30, 32,33).

Los virus del herpes simplex y varicela zoster resistentes al aciclovir y los citomegalovirus resistentes al ganciclovir suelen ser sensibles al foscarnet (32,33).

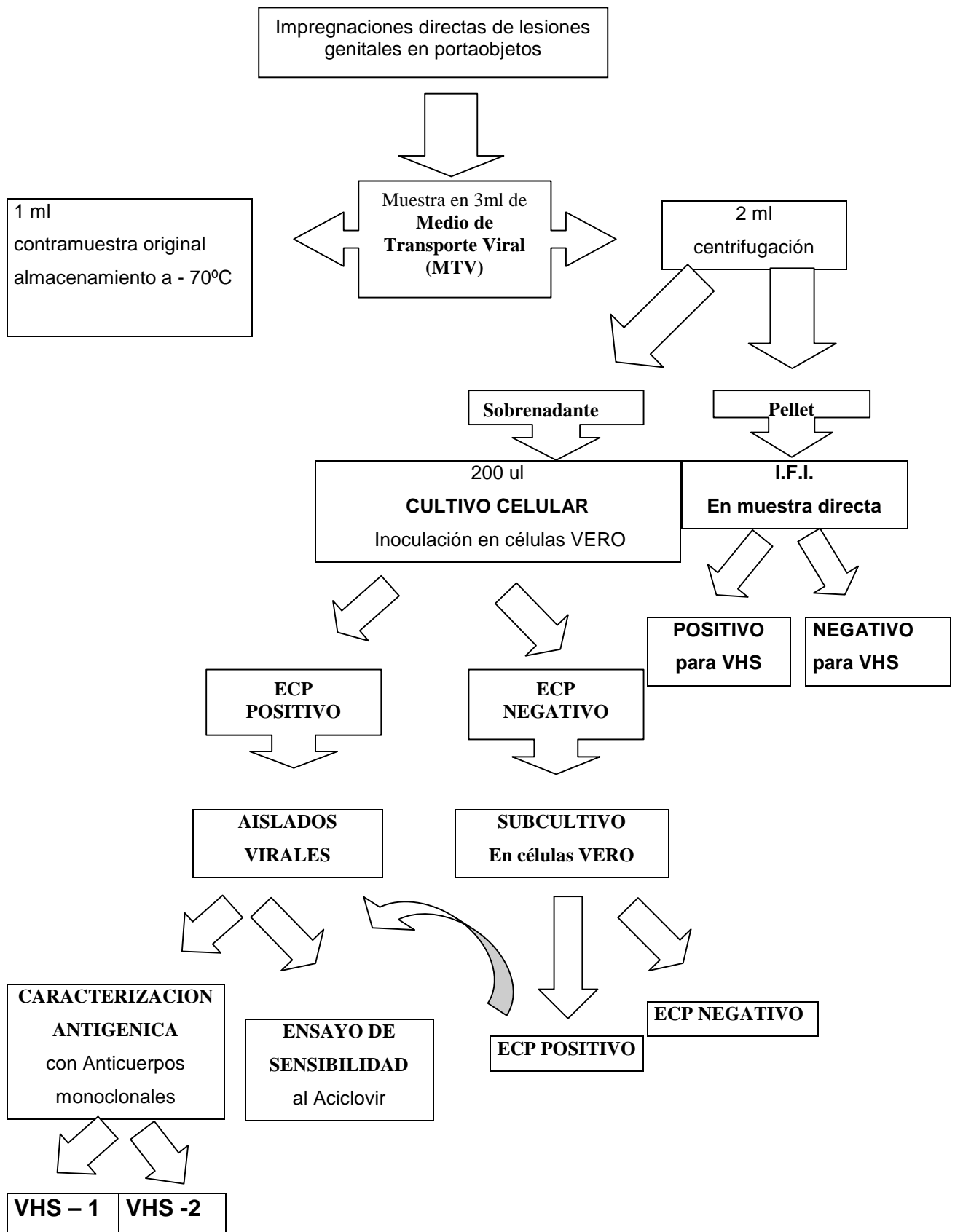
III. FLUJOGRAMA DE ESTUDIO

III.1. MODELO TEÓRICO



III.2. MODELO LABORATORIAL

La recolección de muestras de lesiones genitales herpéticas se realizó por raspado de lesiones vesiculares y ulcerosas de genitales externos e internos de pacientes clínicamente diagnosticados con herpes genital, que asistieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz, las muestras fueron obtenidas por duplicado, para impregnación directa en portaobjetos y detección de antígenos virales por Inmunofluorescencia Indirecta y otra obtenida en medio de transporte viral (M.T.V.) para diagnóstico por IFI en sedimento y aislamiento viral en cultivo celular del sobrenadante, posterior confirmación y caracterización antigénica de los aislamientos virales mediante IFI con anticuerpos monoclonales tipo específicos: anti-herpes simplex virus type 1, y anti-herpes simplex virus type II, ambos obtenidos en ratón de la marca comercial CHEMICON Inc®, y finalmente, la determinación de la sensibilidad antiviral de los aislados obtenidos al aciclovir.



IV. JUSTIFICACIÓN

El tema en estudio nos proporcionará información sobre las características virales y epidemiológicas del virus herpes simplex en 2 grupos poblacionales susceptibles a esta infección de transmisión sexual.

Debido a los reportes de una alta prevalencia de esta infección a nivel mundial, las implicaciones físicas y psicosexuales que conlleva y más aún la devastadora diseminación al neonato, constituye una preocupación, conocer las características epidemiológicas y virológicas de esta infección de transmisión sexual, para determinar su relevancia como problema de salud pública en Bolivia.

Siendo importante la implantación y decisiva la estandarización de métodos de laboratorio, sensibles y específicos como la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), y el aislamiento del VHS en cultivo celular, constituyéndose no solo en una herramienta de apoyo al diagnóstico clínico sino también para el estudio epidemiológico de esta patología en nuestro medio, dada la disponibilidad de medidas terapéuticas antivirales efectivas; por otro lado, esto crea la necesidad del análisis virológico de las cepas virales asociadas a cuadros clínicos que no responden a la terapia antiviral o cuyas recurrencias clínicas son altamente frecuentes, traduciéndose en una vigilancia de la sensibilidad *in vitro* al aciclovir como antiviral de primera elección en nuestro medio, orientando así al mejor manejo terapéutico del paciente.

Los resultados obtenidos aportarán información valiosa al Programa Nacional de ITS/SIDA, y orientarán en la toma de decisiones respecto a adoptar políticas de prevención y control de esta ITS, para evitar la transmisión horizontal de pareja a pareja, la transmisión vertical de madre al hijo durante el parto y evitar complicaciones subsecuentes que esta infección produce.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Sistema Nacional de Información de Salud de Bolivia (SNIS), refiere que en el departamento de La Paz, área urbana, durante el año 2002, se reportaron un total de 2.046 casos sospechosos de úlceras genitales de los cuales un 32% se presenta en varones y un 68% en mujeres (9), la mayor parte fueron reportados del Centro Piloto - La Paz como centro centinela en el Diagnóstico de Infecciones de Transmisión Sexual (captación del 17% del total reportado durante la gestión 2002, estando el resto del porcentaje disperso en 65 centros de salud), motivo por el cual en el presente estudio, se toma en cuenta este Centro de Salud para la captación de pacientes (34). (Anexo I)

Considerando que el Síndrome de úlceras genitales involucra a lesiones producidas por 3 entidades infecciosas (35): *Treponema pallidum* en el caso de Sífilis primaria, *Haemophilus ducreyi* en el caso de Chancroide, y virus herpes simplex en el caso de herpes genital, no se tiene un reporte fiable y válido de los casos de úlcera genital producida por virus herpes simplex, debido principalmente a una evidente subnotificación, asociada al hecho de que en la mayoría de los casos el diagnóstico es solamente clínico dada la carencia de centros de diagnóstico de laboratorio, suministrando a los pacientes tratamiento sintomático, a veces con antibióticos que en el caso de herpes genital no tiene ningún efecto terapéutico, dado que el tratamiento viral es específico.

Siendo el diagnóstico de laboratorio una herramienta útil para determinar las conductas terapéuticas específicas a seguir, diseñar protocolos de control y prevención y estandarizar métodos de laboratorio. La inmunofluorescencia indirecta (IFI), es una técnica de fácil realización que permite determinar el tipo viral involucrado; y el aislamiento viral en cultivo celular además permite determinar la sensibilidad viral al aciclovir, antiviral de amplio uso y de primera elección en nuestro país.

VI. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

VI.1. OBJETIVOS

VI. 1.A. OBJETIVO GENERAL

Determinar las características virológicas y epidemiológicas de los virus herpes simplex en las infecciones de transmisión sexual en trabajadores sexuales comerciales y población general, con diagnóstico clínico de herpes genital que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz, entre abril de 2003 a agosto de 2004.

V. 1.B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar el diagnóstico de laboratorio de virus herpes simplex, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el aislamiento viral en cultivo celular.
2. Determinar la correlación entre el aislamiento viral en cultivo celular y la inmunofluorescencia indirecta.
3. Caracterizar antigénicamente los tipos virales de VHS aislados, mediante inmunofluorescencia indirecta con Anticuerpos monoclonales tipo específicos.
4. Determinar la sensibilidad *in vitro* al aciclovir de los virus herpes simplex aislados.
5. Determinar la frecuencia de herpes genital en trabajadores sexuales comerciales y población general.

6. Conocer el sexo del grupo poblacional con más frecuencia de herpes genital.
7. Conocer la edad de los pacientes afectados por herpes genital.
8. Conocer el nivel de instrucción de los pacientes con herpes genital.
9. Correlacionar la infección por virus herpes simplex con la edad de inicio de actividad sexual.
10. Correlacionar el herpes genital con el número de parejas sexuales de los pacientes de este estudio.
11. Determinar la correlación entre el diagnóstico clínico y el de laboratorio.

VI.2. DISEÑO DE ESTUDIO

El presente trabajo es descriptivo y transversal.

VI.3. TAMAÑO MUESTRAL

Se estudiaron muestras obtenidas de todos los pacientes con diagnóstico clínico de herpes genital, atendidos en el Centro Piloto de la ciudad de La Paz, entre los meses abril de 2003 a agosto de 2004.

VI.4. TIPO DE VARIABLES

Las variables que se estudiaron en el presente estudio fueron en su mayoría cualitativas, dicotómicas y múltiples.

VI.5. POBLACIÓN

La población estudiada estuvo constituida por trabajadores sexuales comerciales de ambos sexos y población general entre hombres y mujeres con diferentes ocupaciones, con diagnóstico clínico de herpes genital (lesiones genitales, glúteos, peri anales y en muslo) que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz.

VI.6. UNIDAD DE ANÁLISIS.

La unidad de análisis son los pacientes, en los que se confirmó la infección por virus herpes simplex dentro de los casos sospechosos de la enfermedad, que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz, y cuyas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA).

VI.7. CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Cada participante recibió en forma escrita y verbal una explicación sencilla y clara del objetivo del estudio, la misma que está contenida en una hoja adicional y luego de su

aceptación, dio su conformidad colocando su nombre y firmando al pie de la hoja de consentimiento informado.

En caso de tratarse de paciente sin capacidad de decisión, el consentimiento por escrito, fue dado por el tutor del mismo. (Anexo II)

VII. METODOLOGÍA.

VII.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes que presenten lesiones vesiculares o ampollas en genitales externos, cérvix, glúteos, peri anales y muslo.
- Pacientes que presenten al examen clínico úlceras en genitales externos, peri anales, muslos, vagina y cérvix.
- Paciente sin tratamiento con aciclovir u otro antiviral por lo menos 48 horas antes de la toma de muestra.

VII.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pacientes que no consientan de manera voluntaria entrar en el presente estudio.
- Paciente que ya hubiera ingresado en el presente estudio.
- Paciente con exudado genital sin lesiones vesiculares, ni úlceras genitales o peri genitales.

VII.3. TIPO DE MUESTREO.

El tipo de muestreo fue por conveniencia.

VII.4. RECOLECCIÓN DE DATOS.

La recolección de datos se realizó mediante una ficha clínica-epidemiológica (Anexo III), donde se consignaron los siguientes datos:

- Antecedentes personales: nombre, edad, dirección, teléfono,
- Procedencia
- Ocupación
- Diagnóstico clínico
- Síntomas y signos
- Tipo de muestra analizada
- Lugar de la lesión: anal, glútea, muslo, cervical, vaginal.
- Antecedentes de episodios previos: duración, severidad.
- Antecedentes de tratamiento antiviral
- Antecedentes de otras ITS
- Antecedentes de inmunosupresión

VII.5. VALIDACIÓN DE DATOS.

Cada cuestionario fue revisado para verificar su llenado completo y correcto. La información fue validada confrontando al azar los datos de cuestionarios completos con la historia clínica del paciente.

Los cuestionarios que no tuvieron la información completa se identificaron claramente y antes del rechazo definitivo, se accedió nuevamente a la historia clínica del paciente para su complementación.

VII.6. ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis de datos se realizó utilizando el programa estadístico Epi. Info.

El análisis estadístico se realizó considerando los dos grupos poblacionales por separado trabajadores sexuales comerciales (TSC) y población general (PG) de ambos sexos. Se consideró como variable dependiente la frecuencia de VHS-2 en los dos grupos y como variables independientes las características ginecológicas y de comportamiento sexual, entre otras, y finalmente una relación entre la frecuencia de VHS y los factores de riesgo según grupo poblacional, para ello se usó una relación de asociación: chi cuadrado, t - student, etc.

VII.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

OBJETIVO	VARIABLE	DEFINICIÓN EMPÍRICA	UNIDAD DE MEDIDA	RANGO DE MEDIDA	OBTENCIÓN DE DATOS
Obtención de datos generales	Edad	Tiempo de vida desde el nacimiento	Cuantitativa	Mayor a 15 Años	¿Cuántos años tiene?
Obtención de datos generales	Ocupación	Actividad a la que se dedica	Cualitativa	Trabajadora Sexual comercial Otra ocupación	¿A qué se dedica?
Obtención de datos generales	Procedencia	Lugar de residencia los últimos 3 años.	Cualitativa		¿Donde ha vivido o vive los últimos 3 años?
Obtención de datos clínicos	Diagnóstico Clínico	Valoración del médico tratante que observe	Cualitativa	Presencia de: úlceras vesículas	Diagnóstico Clínico compatible de

		signos y síntomas clínicos de herpes genital.		ampollas	infección por VHS
Obtención de datos clínicos	Edad de inicio de actividad sexual.	Edad a la que se tuvo la primera relación sexual	cuantitativo		¿A que edad inicio su vida sexual?
Obtención de datos clínicos	Número de parejas sexuales	Número de parejas sexuales en el momento de la toma de muestra	cuantitativo		¿cuántas parejas sexuales tiene?
Obtención de datos clínicos	Antecedente de herpes genital	Aparición de vesículas y/o úlceras en genitales externos o internos previos a la consulta actual.	Cualitativa	Primoinfección Recurrencia	¿ Primera vez que presentan éstas lesiones (vesícula y/o úlceras)?
Obtención de datos clínicos	Lugar de toma de muestra	Lugar de donde se obtiene la muestra para análisis de laboratorio	Cualitativa	-Vesículas genitales -Úlcera genital -Úlcera anal -Otro lugar adyacente	Lugar donde se presentan las lesiones.
Obtención de datos clínicos	Antecedente de tratamiento con aciclovir.	Tratamiento antiviral específico con aciclovir	Cualitativo	SI NO ¿Cuándo?	¿Ha recibido tratamiento con aciclovir?
Obtención de datos clínicos	Antecedente de otras infecciones Transmisión Sexual	Infección de tipo viral, bacteriano o parasitario, adquirida por contacto sexual.	Cualitativa	Otras I.T.S.: SI NO	¿Anteriormente ya fue tratada por Infección de Transmisión sexual? ¿Cuál?
Obtención de datos de Laboratorio	Aislamiento de VHS en Cultivo Celular	Inoculación de virus en Células VERO	Cualitativo	ECP POSITIVO ECP NEGATIVO	Procesamiento de muestras en Laboratorio.
Obtención de datos de Laboratorio	Técnica IFI	Detección de Antígenos virales VHS-1 y VHS-2	Cualitativo	VHS-1 VHS-2 Negativo	Procesamiento de muestras en Laboratorio.
Obtención de datos de Laboratorio	Sensibilidad antiviral	Detección de Sensibilidad o Resistencia al aciclovir.	Cualitativo	-Sensible -Resistente	Procesamiento de Muestras en Laboratorio.

VIII. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS.

VIII.1. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.

VIII.1.A. Material fungible:

- Puntas para micropipetas
- Gradillas
- Tubos eppendorf
- Hisopos estériles
- Cinta parafilm
- Papel absorbente
- Microplacas de 96 pocillos fondo plano para cultivo celular

VIII.1.B. Material de vidrio:

- Pipetas
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de centrifuga
- Frascos para cultivo celular
- Tubos de cultivo celular
- Porta objetos de 2 anillos
- Cubreobjetos
- Cámara húmeda

VIII.1.C. Equipos:

- Centrifugadora
- Estufa de incubación
- Cámara de flujo laminar clase IIA/B3
- Microscopio de luz invertida
- Microscopio óptico

- Microscopio de fluorescencia
- Congelador de -70° C
- Congelador de -20° C

VIII.2. REACTIVOS

- Medio de transporte Viral (solución balanceada de Hanks conteniendo antibióticos, antimicótico y estabilizador proteico).
- Antibióticos: Penicilina sódica, estreptomina, gentamicina.
- Antimicótico: Anfotericina B
- Solución balanceada de fosfatos (PBS) pH 7.2
- Acetona
- Glicerina tamponada
- Alcohol 70°
- Hipoclorito de sodio al 0,5%
- Medio de Cultivo Celular E-MEM
- Tripsina
- Suero fetal bovino
- Anticuerpos monoclonales virus específicos: anti-herpes simplex virus type 1 y anti-herpes simplex virus type II, ambos obtenidos en ratón de la marca comercial CHEMICON Inc®.
- IgG anti-ratón conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) preparado en cabra, de la marca comercial SIGMA ®, como segundo anticuerpo.
- Aciclovir p.a. (proporcionado por Laboratorios Farmacéuticos LAFAR)

VIII.3. PROCEDIMIENTO

VIII.3.A. TOMA DE MUESTRA

Las muestras fueron obtenidas por los médicos tratantes en el Centro Piloto de la ciudad de La Paz, mediante impregnación directa de la lesión (es) genital (es), sobre portaobjetos por duplicado, seguido de raspado de las lesiones con 2 hisopos de algodón estériles, los que fueron introducidos en un tubo de centrifuga conteniendo 3 ml de Medio de transporte viral (MTV), (Solución balanceada de Hanks, con estabilizador proteico, antibióticos y antimicótico). Las muestras así obtenidas se mantuvieron a 4°C, hasta su traslado al laboratorio de Virología del INLASA, sin exceder un tiempo de 24 horas para preservar la viabilidad viral. (Anexo IV)

VIII.3.B. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

VIII.3.B. a) INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Esta técnica nos permite detectar la presencia de virus herpes simplex tipo 1 y tipo 2 haciendo uso de anticuerpos monoclonales tipo específicos.

Se empleó esta técnica para comparar su rendimiento en el diagnóstico rápido de VHS, utilizando dos formas de obtención de muestras:

- a. IFI en impregnación directa de lesiones genitales sobre portaobjetos
 - b. IFI en el sedimento de muestras obtenidas en MTV
-
- a. Las improntas de la(s) lesión (es) genital (es) impregnadas directamente sobre los portaobjetos se procesaron de la siguiente manera, una impronta se guardó a

-70°C como contramuestra de control y la otra se procedió a fijar en acetona fría a 4°C por 10 minutos.

- b. La muestra obtenida en MTV fue alicuotada en 1 ml como contramuestra original y se guardó a -70°C y 2ml fueron centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue separado para inoculación de cultivos celulares y el remanente almacenado a -70°C y el sedimento fue lavado con PBS pH=7,2, centrifugado a 1500rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado por decantación y del sedimento celular se prepararon 2 improntas en duplicado. Los portaobjetos fueron secados y fijados en acetona fría por 10 minutos.

En ambos casos una vez realizada la fijación se procedió al teñido, dispensando, en pocillos separados, 10ul de cada anticuerpo monoclonal tipo específico: anti VHS-1 y anti VHS-2 obtenidos en ratón, previamente titulados y diluidos con PBS pH=7,2 azida sódica. Posteriormente, se dejó en incubación a 37°C por 15 minutos en cámara húmeda, se lavó con PBS pH=7,2 por 5 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente y se dispensó 10 ul de IgG antirratón conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína), previamente titulado y diluido en azul de Evans 1:1000 en agua destilada. Nuevamente, se dejó en incubación a 37°C por 15 minutos, en cámara húmeda, se lavó con PBS pH= 7,2 por 5 minutos, se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió al montaje con glicerina tamponada pH=9. Finalmente, se realizó la observación microscópica en microscopio de fluorescencia OLYMPUS ®, con objetivo seco 20X. En cada tinción se emplearon controles positivos y negativos para cada virus estudiado, los mismos fueron obtenidos a partir de una lesión de herpes labial para el VHS-1 y de una genital para el VHS-2, estos virus fueron obtenidos previo al inicio del estudio y caracterizados como tales mediante cultivo celular e inmunofluorescencia en cinco ensayos repetidos. Asimismo, se emplearon slides controles positivos comerciales Kallestad-Pathfinder® (2, 24, 25, 29, 36, 37).

La interpretación de los resultados fue como sigue: (Anexo V)

POSITIVO: Presencia de fluorescencia verde manzana característico en las células infectadas contra un fondo rojo de células no infectadas.

NEGATIVO: Células teñidas de rojo con ausencia de fluorescencia verde manzana.

VIII.3.B. b) CULTIVO CELULAR

Las muestras en Medio de Transporte Viral (MTV) fueron procesadas en campana de flujo laminar Clase II A/B3 NUAIRE®, como sigue: Se separó una alícuota de 1 ml de muestra original en tubo eppendorf estéril, con glicerina al 10% final y se guardó a -70°C , como contramuestra original. La muestra restante se centrifugó a 1.500 rpm a 4°C por 10 minutos, 200ul del sobrenadante fueron inoculadas por duplicado en tubos de cultivo celular con monocapas confluentes de células VERO (Células de riñón de mono verde del África ATCC CCL 81), se dejaron en adsorción a 37°C por 1 hora, para luego agregar medio de mantenimiento (E-MEM con 2% de Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos al 0,1%: Penicilina G Sódica, Estreptomina y Gentamicina, y antimicótico: anfotericina B al 1%). Los tubos inoculados se mantuvieron a 37°C por 7 días con observación diaria, bajo microscopio invertido de Luz (WILD®) hasta detectar la aparición de ECP (efecto citopático) característico de la infección por VHS. Todos los cultivos fueron confirmados mediante Inmunofluorescencia Indirecta empleando los mismos reactivos y procedimientos descritos anteriormente (2, 24, 25, 29, 36, 38).

La interpretación de resultados fue como sigue: (Anexo VI)

- Aislamiento positivo (+) = muestra que genere ECP característico (células aumentadas de volumen, redondeadas y adheridas entre sí en forma homogénea o agrupadas con relación a la formación de focos de lisis celular) además de Inmunofluorescencia positiva.

- Aislamiento negativo (-) = muestra que no genere ECP característico de VHS e inmunofluorescencia negativa. Se realizaron subcultivos de todas las muestras negativas, para confirmar el diagnóstico.
- Indeterminada = muestra con ECP e Inmunofluorescencia no definidos. En este caso también se procedió a realizar un subcultivo.

IX. PRUEBA DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* AL ACICLOVIR

IX. 1. TITULACIÓN VIRAL

Los aislados virales fueron sometidos a prueba de sensibilidad *in vitro* al aciclovir mediante la técnica de Dosis Infecciosa 50% en cultivo celular (TCID₅₀, Tissue Culture Infectivity Dose 50%) determinando el título viral como sigue: A partir cada aislado viral (virus stock) se tituló, preparando diluciones en forma logarítmica desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ en medio E-MEM con 1% de SFB, antibióticos y antimicótico, de cada dilución viral se infectaron cuatro pocillos de microplacas estériles de fondo plano para cultivo celular con monocapas confluentes de células VERO, previamente preparadas. Asimismo, se incluyeron en cada ensayo 2 pocillos de control “virus stock puro” inoculando 100ul y 2 pocillos de controles célula sin virus a los que se dispensaron 100ul de medio de mantenimiento E-MEM. Se dejó en adsorción 1 hora a 37°C, en incubadora con 5% de CO₂. Posteriormente, se enrasaron todos los pocillos con 100ul de medio E-MEM al 1% de SFB, antibióticos y antimicótico, se dejó en incubación a 37°C en presencia de 5% de CO₂ por 72 horas (32, 34, 39, 40). Finalmente, se determinó el título viral mediante observación microscópica bajo microscopio de luz invertida (WILD®) determinándose la TCID₅₀ empleando el método de Reed y Muench, donde el título viral es la máxima dilución del virus que ha producido ECP en el 50% de los pocillos con cultivos celulares infectados (39).

IX.2. METODO DE REDUCCIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO AL 50%.

Microplacas de 96 pocillos para cultivo celular con monocapas confluentes de células VERO fueron inoculadas con 50ul de 100 TCID₅₀ del aislado viral preparado en medio E-MEM al 1% de SFB, antibióticos y antimicótico, se dejó en adsorción 1 hora a 37°C en Incubadora con 5% de CO₂. En este lapso de tiempo se prepararon diluciones de Aciclovir p.a. gentilmente proporcionado por Laboratorios Farmacéuticos **LAFAR** de la ciudad de La Paz, las diluciones comprendían concentraciones de 0,2- 0,4 – 0,8 – 1,6 – 3,2 – 6,4 y 10ug/ml en medio E-MEM al 1% de SFB, antibióticos y antimicótico, posteriormente, 150ul de cada dilución fueron dispensados en 4 pocillos de células infectadas. Se dejó en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 72 horas. En cada ensayo y en la misma microplaca se incluyeron controles de Título viral, controles de 100TCID₅₀, control de virus stock, control de aciclovir y controles de células no infectadas. Anexo VII

Se determinó la dosis inhibitoria 50% (IC₅₀) de cada aislado viral mediante el método de Reed y Muench (39,41), esto es, la concentración de aciclovir a la cual el 50% de los cultivos celulares infectados no presentan ECP. Se consideró una IC₅₀ de 3ug/ml de aciclovir, como punto de corte para determinar la sensibilidad o resistencia de los virus al antiviral (36, 40, 41, 42).

X. RESULTADOS.

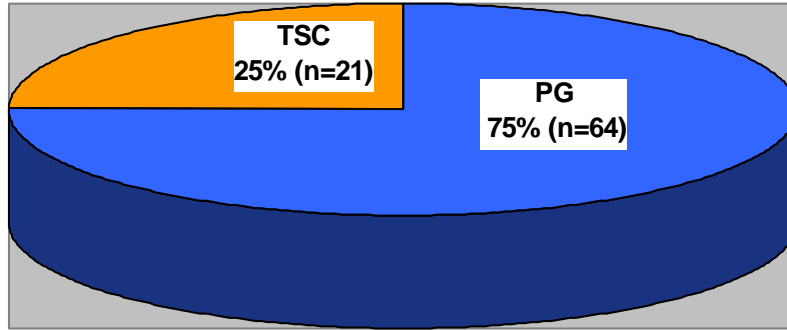
Entre abril de 2003 a agosto de 2004, se obtuvieron un total de 85 muestras procedentes de pacientes con lesiones genitales, diagnosticados clínicamente como herpes genital que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz.

En inicio se describen las características epidemiológicas de la población estudiada y a continuación los resultados obtenidos en base a las pruebas de laboratorio.

Es importante mencionar que el presente estudio realiza la descripción de las características epidemiológicas y el análisis de los resultados obtenidos, basado en dos grupos de estudio, clasificados como “población general” (PG) al que corresponden todos los pacientes con ocupaciones diversas al segundo grupo de “Trabajadores sexuales comerciales” (TSC), por su importancia en las ITS.

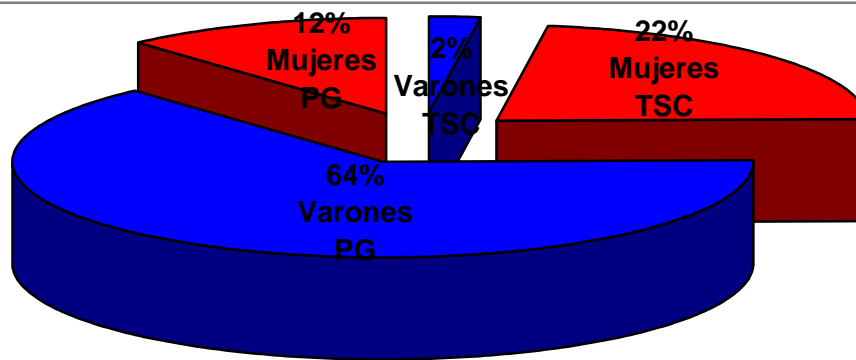
Según su ocupación y sexo, 64 pacientes (10 mujeres y 54 varones) corresponden a la PG y 21 (19 mujeres y 2 varones) al grupo de TSC (Figura 1 y 2, tabla 1).

FIGURA 1
NUMERO DE PACIENTES ATENDIDOS CON
DIAGNOSTICO CLINICO DE HERPES GENITAL, SEGÚN
OCUPACIÓN



N= 85
 TSC= Trabajador sexual comercial
 PG= Población general

FIGURA 2
NÚMERO TOTAL DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE
HERPES GENITAL, SEGUN OCUPACIÓN Y SEXO



PG= Población general
 TSC= Trabajador sexual comercial

N= 85

FIGURA 3
NUMERO TOTAL DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HERPES
GENITAL, SEGUN OCUPACIÓN Y NIVEL DE INSTRUCCION,

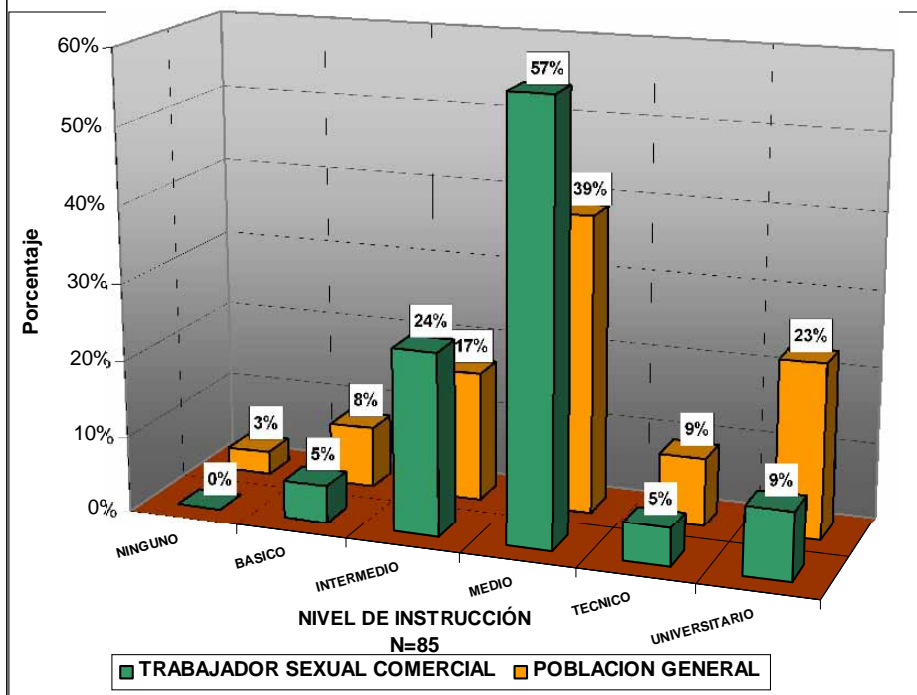


FIGURA 4
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HERPES GENITAL,
SEGÚN EDAD DE INICIO DE ACTIVIDAD SEXUAL

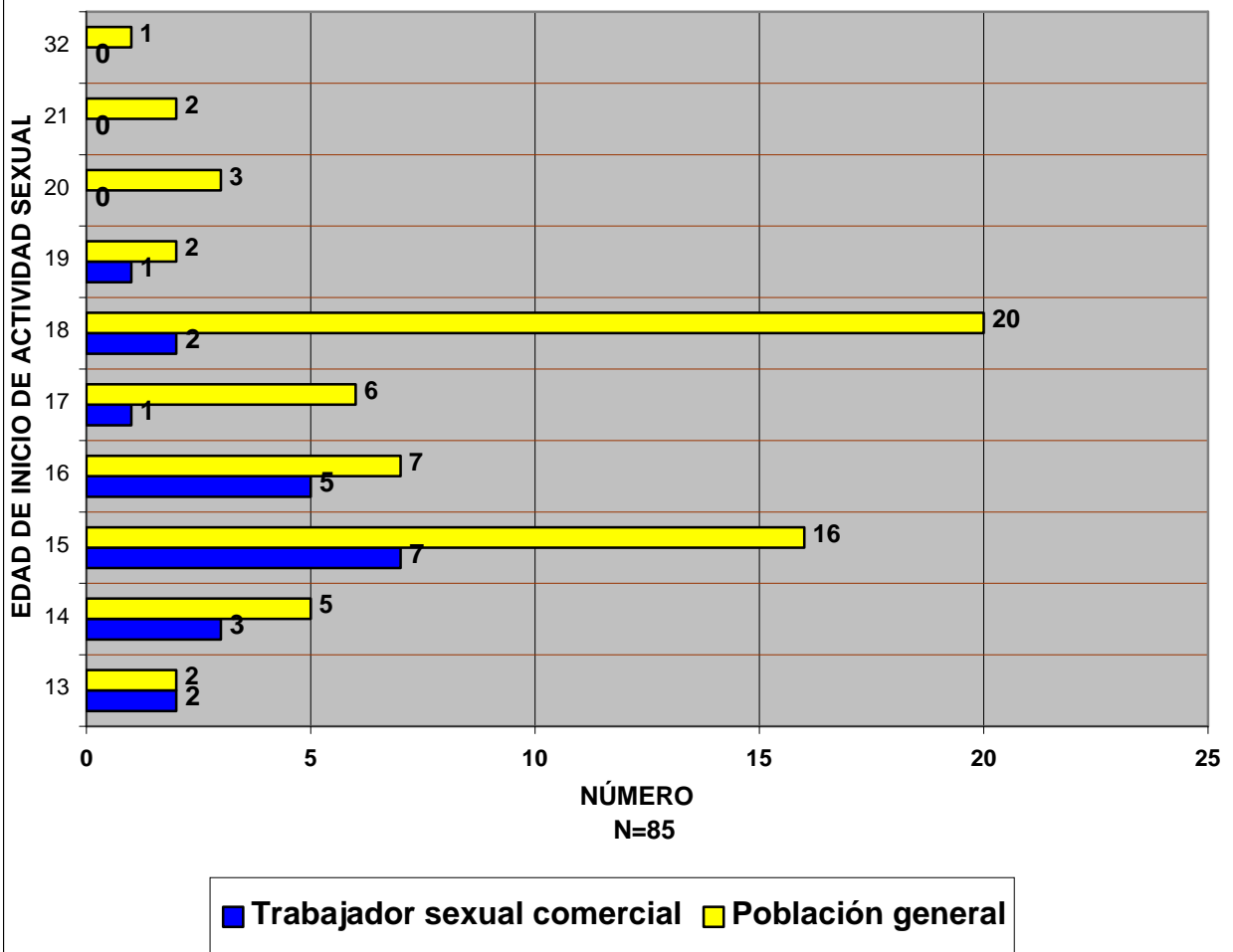
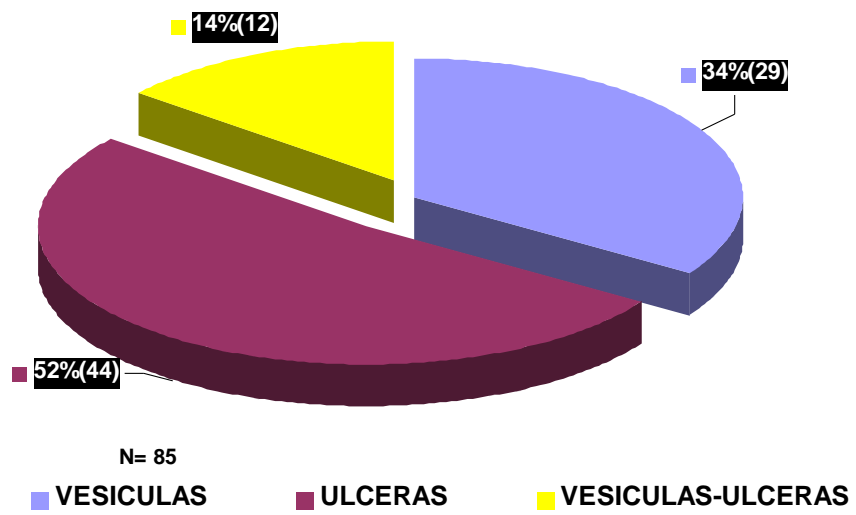


FIGURA 5
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE HERPES
GENITAL, SEGÚN TIPO DE LESION



cantidad de células recolectadas y además, en las muestras obtenidas por impregnación directa, por la presencia de abundante cantidad de mucus que interfirió en la observación microscópica.

Al comparar los resultados de estas muestras indeterminadas por IFI con el aislamiento en cultivo celular, se observó que en el caso de la IFI en sedimento celular todas fueron negativas al cultivo celular y por IFI en impregnación directa, en 3 de ellas se obtuvieron aislamientos virales.

Al hacer un análisis de correlación, entre el cultivo celular y la IFI en impregnación directa de las lesiones genitales, sobre un total de 72 muestras, esto sin tomar en cuenta las indeterminadas (13 muestras), se obtuvo una sensibilidad del 95%, una especificidad del 88%, con un valor predictivo positivo del 78%, y un valor predictivo negativo del 98%, el valor de chi-cuadrado fue de 41,91 estadísticamente es significativo ($p < 0,0001$), con un nivel de confianza del 95%.

Cuando se toma en cuenta para el análisis de chi-cuadrado las 13 muestras indeterminadas, se obtuvo un valor de 46,71, (sobre un total de 85 muestras), estadísticamente significativo ($p = 0,0001$).

En el análisis de correlación entre el cultivo celular y la IFI en sedimento celular, sobre un total de 72 muestras, sin tomar en cuenta las 13 muestras indeterminadas, se obtuvo una sensibilidad del 88%, especificidad del 89%, valor predictivo positivo del 82% y un valor predictivo negativo de 93%. Valor de chi-cuadrado de 38,44, mostrando una relación estadísticamente significativa ($p < 0,0001$), con un nivel de confianza de 95%. (Tabla 4)

Al realizar en análisis de chi-cuadrado incluyendo las 13 muestras indeterminadas, se obtuvo un valor de chi-cuadrado 52,1, estadísticamente significativo (valor de $p < 0,001$).

FIGURA 6
FRECUENCIA DE VIRUS HERPES SIMPLEX,
AISLADOS DE LESIONES GENITALES, SEGÚN
OCUPACIÓN

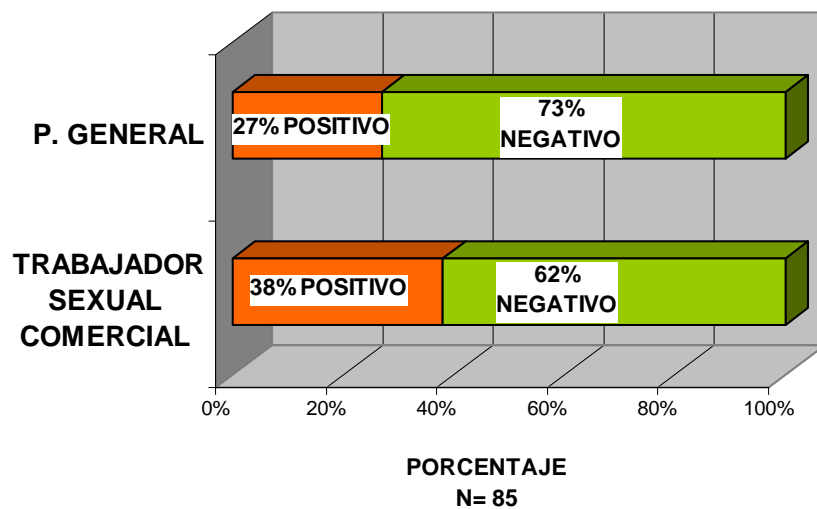
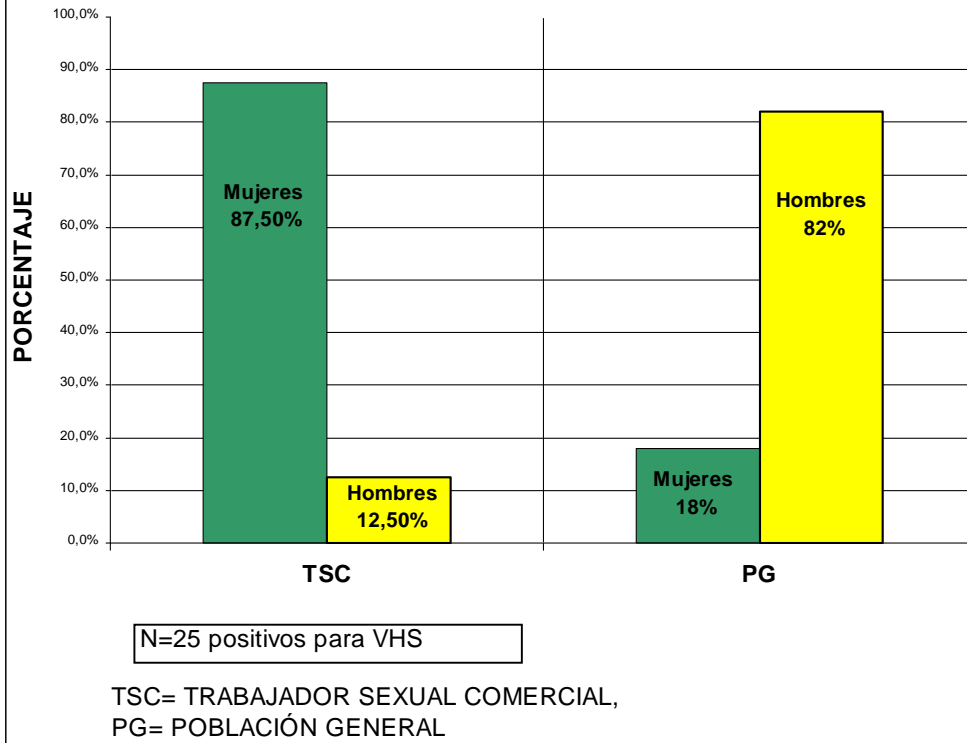


FIGURA 7
FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE VIRUS HERPES SIMPLEX
EN LESIONES GENITALES, SEGÚN SEXO Y OCUPACIÓN,



frecuencia. Tanto en el grupo de TSC como en la población general de igual manera, las mayores frecuencias se observaron en el nivel de instrucción media, con un 75% y 47% respectivamente. (Tabla 5).

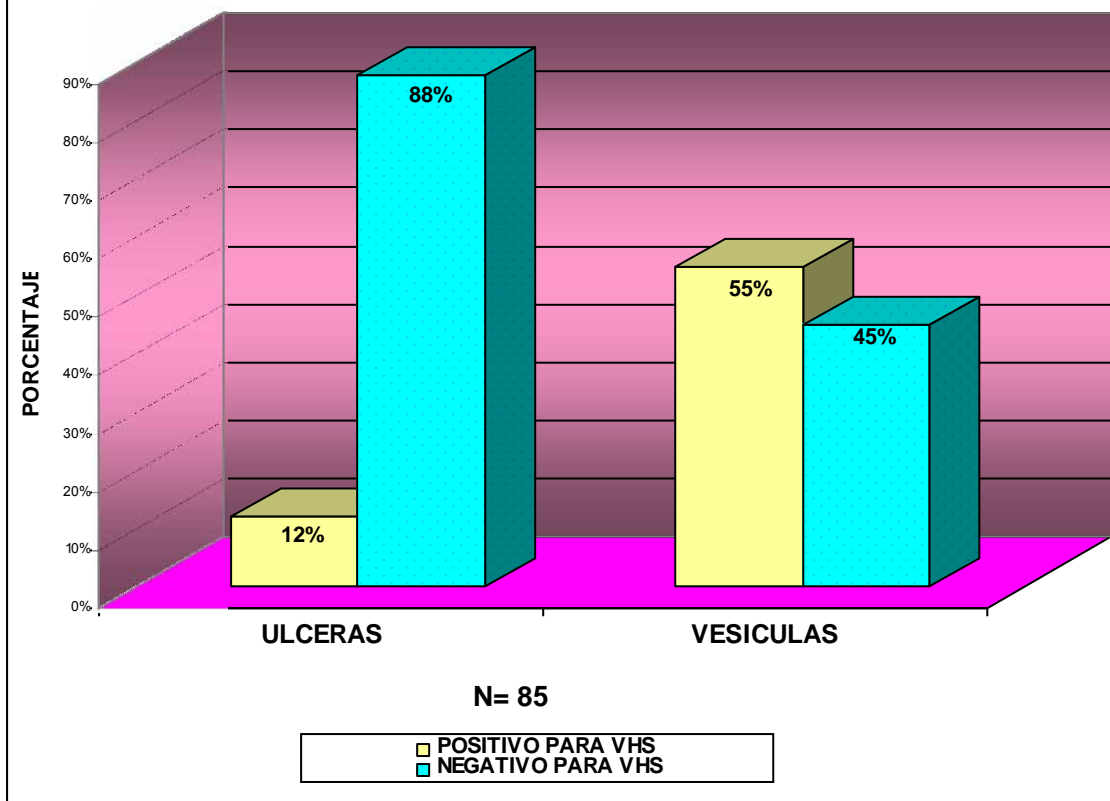
La edad de inicio de actividad sexual en el grupo de TSC con herpes genital diagnosticado por laboratorio, refiere un promedio de 16 años con una DS de 1; en el grupo de la PG, la media de inicio de actividad sexual fue de 17 años con una DS de 2. La prueba de t de Student para la edad de inicio de actividad sexual, mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (valor $p > 0.792$) (Tabla 6).

En el grupo de población general positivos para VHS, el 29% refirió una sola pareja sexual y el 71% 2 o más parejas sexuales (mínimo 2 y máximo 20), con un promedio de 5 parejas sexuales. Cuando se compara el número de parejas sexuales de esta población con la PG con diagnóstico negativo en la cual el promedio de parejas sexuales fue de 2, al realizar la prueba de t de Student se observó un valor de $p < 0,005$, estadísticamente significativo. En el grupo de TSC positivos para VHS, el promedio de parejas sexuales fue de 17. Al realizar la prueba de t de Student se obtuvo un valor de $p < 0,005$, estadísticamente significativo.

De los 25 casos positivos para herpes genital, 14 (56%) corresponden a recurrencias de las cuales 4 pacientes recibieron tratamientos con aciclovir en sus recurrencias previas y 10 pacientes recibieron aciclovir por primera vez luego de la confirmación diagnóstica de laboratorio proporcionado por este estudio; y los restantes 11 (44%) corresponden a primoinfección.

Solo un 20% (3 pacientes de la PG y 2 TSC) de los 25 casos positivos tenían antecedentes de otras ITS: sífilis, gonorrea, infección por *Chlamydia trachomatis* y molusco contagioso.

FIGURA 8
RELACION DEL TIPO DE LESIÓN GENITAL
CON EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO



presencia de lesión ulcerosa y aislamiento viral negativo, en relación a la presencia de vesículas y aislamiento viral positivo, valor de $p < 0.01$.

XI. DISCUSIÓN.

El presente estudio se constituye en el primero realizado en Bolivia, motivo por el cual, los datos obtenidos son de gran aporte al Programa Nacional de ITS/SIDA del Ministerio de Salud y deportes, para la vigilancia, control y prevención de esta patología. Toda vez que se han tomado en cuenta dos grupos poblacionales: una de trabajadores sexuales comerciales y otra, sexualmente activa con diferentes ocupaciones, que según la literatura son catalogadas como de alto y mediano riesgo, respectivamente (1).

Se estudiaron un alto número de casos (85 pacientes) que acudieron a la consulta médica por presentar una patología, clínicamente diagnosticada como herpes genital en un centro de salud de referencia para el tratamiento, control y prevención de ITS, por lo tanto, con un alto nivel de captación de pacientes con esta enfermedad (ANEXO I). El herpes genital en nuestro país está incluido dentro del tratamiento sintomático de “Úlceras genitales” realizándose la terapia antiviral específica, según criterio, únicamente clínico (35). La disponibilidad de técnicas de diagnóstico virológico específicas y sensibles para VHS, se constituyen en una herramienta fundamental para el clínico y determinan la conducta terapéutica a seguir, dada la disponibilidad de efectivos antivirales específicos.

El aislamiento viral en cultivo celular empleada en el presente estudio, se constituye en la técnica de referencia o estándar de oro para el diagnóstico de VHS (29), frente a otros métodos rápidos de diagnóstico como ser la Inmunofluorescencia Indirecta en muestras impregnadas directamente en portaobjetos y una variante de esta técnica

como ser la Inmunofluorescencia Indirecta en sedimento celular obtenido en medio de transporte viral, realizados en este estudio.

La frecuencia de VHS aislados de pacientes con clínica compatible de herpes genital encontrado en el presente estudio fue de 29,4%.

Los resultados negativos obtenidos, pudieron ser debidos a diferentes factores como ser:

a) Diagnóstico clínico erróneo, debido a la poca experiencia de los médicos con este tipo de ITS por la aparente baja frecuencia, y la poca importancia que se le brinda por falta de lugares de diagnóstico de laboratorio, es así que en este estudio se ha observado que 1 paciente (1,7%) de los 60 casos negativos fue positivo para Chancro blando mediante tinción de Gram y 7 pacientes (12%) de los mismos tuvieron una prueba de RPR "Reactivo" con diferentes títulos, de los cuales 3 fueron confirmados con el método de referencia de microhemaglutinación del *Treponema Pallidum* (MHATP). Así, los datos de este estudio refieren que el 20% de los casos positivos para herpes genital se acompañó de otras ITS (clamidia, gonorrea, sífilis, molusco contagioso) de los cuales, 2 pacientes presentaron sífilis además de herpes genital lo cual concuerda con lo referido en la literatura internacional que indica que la presencia de más de una ITS, aumenta la probabilidad de adquirir herpes genital.

b) Tipo de lesión presentada al momento de la toma de muestra. Para el aislamiento viral en cultivo celular las muestras más representativas, en forma decreciente, son las obtenidas de lesiones vesiculares, lesiones pustulosas, úlceras y lesiones costrosas, (11). Así en este estudio el 75% de los casos negativos presentaron lesiones ulcerosas en el momento de la toma de muestra.

c) Tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y la toma de muestras. A mayor número de días transcurridos desde el inicio de síntomas menor la posibilidad de aislar el virus, dado que las muestras positivas tuvieron un promedio de 4 días. En

cambio las que resultaron negativas tuvieron un promedio de 10 días. El valor de t de Student de 4,67, estadísticamente significativo ($p < 0,000$ con un nivel de confianza del 95%).

d) Pacientes que hayan estado con terapia antiviral previo a la toma de muestras y que no lo reportaron.

e) Error en algún momento del procedimiento diagnóstico desde la toma de muestras, transporte y procesamiento en laboratorio, aún cuando se tomaron todas las medidas necesarias para evitarlo.

Según el análisis de correlación hecho entre el diagnóstico por cultivo celular (CC) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) ya sea de impregnación directa y la IFI de sedimento celular, ambas se pueden considerar como una alternativa de diagnóstico al cultivo celular, principalmente en aquellos casos donde los días de evolución de la lesión no sobrepase los 4 días y se observen lesiones vesiculares.

El valor de chi cuadrado tanto en la IFI de impregnación directa, como la IFI de sedimento celular versus cultivo celular sobre un total de 85 muestras, estadísticamente significativo, en el primer caso indica que un resultado indeterminado por IFI no se debe al azar sino que es debido a algún factor inherente, en este caso tanto a la técnica de tinción como a la muestra, respecto al primero, 3 muestras (23%) fueron positivas en cultivo celular, por lo tanto, la presencia de mucus interferiría con la observación microscópica o con la reacción antígeno anticuerpo; con relación a la muestra, el 85% de ellas corresponden a lesiones ulcerosas con 10 días de evolución entre la aparición de signo/sintomatología y la toma de muestra, en comparación a la presencia de vesículas que tienen un promedio de 4 días de evolución. En el segundo caso, un resultado indeterminado por IFI en sedimento celular tampoco se debe al azar, sino que es debido a algún factor inherente a la muestra y no necesariamente a la técnica ya que las 13 muestras indeterminadas fueron negativas en cultivo celular. Este resultado podría

deberse a que el 85% de estas muestras corresponden a lesiones ulcerosas, con un promedio de 10 días transcurridos entre el inicio de los síntomas/signos y la toma de muestra, en relación a la presencia de lesiones vesiculares que tienen un promedio de 4 días de evolución.

El 100% de los virus aislados correspondió a VHS-2, resultado que concuerda con lo referido en la literatura que indica que ambos tipos de VHS pueden causar herpes genital pero el principal agente causal de las infecciones genitales es VHS-2 con un 85%, 86% y 90% de frecuencia (1,18, 22).

Con respecto a la sensibilidad *in vitro* de los VHS al aciclovir, en el presente estudio el 100% de los aislados virales fueron sensibles al aciclovir, y todos provienen de pacientes inmunocompetentes, lo cual está en relación con lo publicado en la literatura internacional con respecto a pacientes inmunocompetentes, que refiere una baja o nula resistencia al aciclovir en estos pacientes (36).

Como era de esperarse, se encontró mayor frecuencia de herpes genital en trabajadoras sexuales comerciales (38%), que en la población general (27%), que concuerda con datos de la literatura internacional en estudios de seroprevalencia que refieren mayor frecuencia de herpes genital en TSC que en la PG, así en Inglaterra refiere un 25%, 48% en EEUU y 65% en México. Esta mayor frecuencia de herpes genital en TSC está en relación a factores inherentes a su misma ocupación, debido a que este grupo mantiene un alto número de contactos sexuales con individuos diferentes. (20,46).

En Trabajadores Sexuales Comerciales (TSC) la frecuencia de aislamiento de VHS fue de 38%, de la cual el mayor porcentaje (87,5%) corresponde al sexo femenino. En cambio en la población general (PG) la frecuencia de aislamiento fue del 27%, correspondiendo un alto porcentaje (82%) al sexo masculino. Sin embargo, la distribución de la población estudiada en ambos sexos no es comparable ya que en el grupo de TSC el mayor número de pacientes estudiados son mujeres (19/21) y en

la PG el mayor número de pacientes son varones (54/64). Situación que debe ser evaluada en próximos estudios que capten mayor población y donde la distribución de ambos sexos en los dos grupos sea comparable.

En relación a la edad de los pacientes con diagnóstico virológico positivo para herpes genital, de los dos grupos estudiados, existe diferencia estadísticamente significativa entre TSC y PG, (24 y 30 años respectivamente); resultados que refuerzan la realidad social y económica de la población que se dedica a la prostitución a edades más tempranas y con riesgo de adquirir ITS.

En cuanto a la variable nivel de instrucción, no se encontró asociada con la infección de herpes genital, lo cual difiere de estudios similares, realizados en México y EEUU, que refieren que a una menor escolaridad corresponde un mayor riesgo de infección por VHS, en el presente estudio los casos positivos por VHS tanto en TSC y PG refirieron en su mayoría un nivel de instrucción media (75% y 47% respectivamente), sin embargo en el grupo de TSC solo un paciente refirió tener estudios universitarios lo que reflejaría un estancamiento en el nivel de instrucción de estos pacientes, sin alternativas de seguir sus estudios y por lo tanto, de aspirar a una calidad de vida mejor.

La edad de inicio de actividad sexual referido por los pacientes en el presente estudio no se constituyó en una variable de importancia que conduzca a un riesgo de adquirir infección genital herpética.

En relación al número de parejas sexuales, los resultados confirman que hay una mayor probabilidad de infección por VHS, a mayor número de parejas sexuales, demostrado estadísticamente, en cuanto los TSC tienen mayor probabilidad de adquirir herpes genital en relación a la PG sexualmente activa. Así mismo, dentro del grupo de la PG, los que refieren más de 2 parejas sexuales tienen mayor probabilidad de adquirir herpes genital que la población general con 1 ó 2 parejas sexuales.

Así, como en el conjunto de las ITS, las relaciones múltiples se convierten en factor de riesgo de contagio, aspecto que no siempre es reflexionado por la población, esto asociado a la falta de información sobre la prevención del herpes genital por parte de las autoridades en salud, conducen a un efecto multiplicador de la transmisión sexual de esta infección.

56% de los casos confirmados para herpes genital en este estudio corresponden a recurrencias, de los cuales 71,4% nunca hicieron tratamiento antiviral específico, lo que quiere decir que trataron sus recurrencias con medicamentos no adecuados, lo cual ratifica más la necesidad de un diagnóstico de laboratorio preciso y específico.

Por último con este estudio se ratifica la utilidad de realizar el diagnóstico virológico para VHS, que apoyará en primera instancia al médico clínico para la aplicación de un tratamiento antiviral específico y por lo tanto va en directo beneficio del paciente, y de la salud pública, al evitar el uso innecesario de antibióticos, dada la utilización de terapia sintomática para “úlceras genitales” solamente, y en segunda instancia y la más relevante, la generación de información al Sistema Nacional de Información de Bolivia (SNIS), para la vigilancia epidemiológica de esta patología que determinará las medidas de prevención y control. Así mismo, el estudio de la sensibilidad *in vitro* de este virus al aciclovir se constituye en una herramienta importante para detectar precozmente la aparición de cepas resistentes a este antiviral de uso indiscriminado en nuestro medio.

XII. CONCLUSIONES

1. El virus herpes simplex tipo 2 es el agente etiológico del herpes genital en pacientes que acudieron al Centro Piloto de la ciudad de La Paz.
2. La prueba rápida de Inmunofluorecencia Indirecta, tanto de impregnación directa de la lesión como de sedimento celular, son una técnica de diagnóstico alternativa al aislamiento viral en Cultivo celular.
3. Los aislados virales de VHS son sensibles al aciclovir.
4. El herpes genital, se presenta con mayor frecuencia en trabajadoras sexuales comerciales que en la población general.
5. La edad promedio de los pacientes con herpes genital en la Población general es de 30 años y 24 años en Trabajadores Sexuales Comerciales.
6. El nivel de instrucción de los pacientes con herpes genital, es el nivel medio.
7. La edad de inicio de la actividad sexual no está relacionada con la infección genital herpética en ambas poblaciones.
8. Existe una asociación entre la infección por VHS y mayor número de parejas sexuales.

El presente trabajo constituye el primer paso en el estudio de virus herpes simplex, en cuanto a su epidemiología y la necesidad de un diagnóstico específico de laboratorio para lo cual se propone una técnica alternativa para el diagnóstico de herpes genital bastante prometedora, sin embargo, para su validación sería

importante captar una población mayor de pacientes en más centros de salud, a fin de verificar los valores de VPP y VPN obtenidos.

XIII. RECOMENDACIONES.

1. Realizar un próximo estudio, de diagnóstico de herpes genital, incluyendo más centros de salud.
2. Continuar con el diagnóstico de herpes genital, mediante el IFI, como un diagnóstico de rutina en el Centro Piloto, como centro de referencia de ITS.
3. Realizar un estudio de PCR, en las muestras guardadas de los pacientes estudiados, para correlacionar los resultados con los de cultivo celular.
4. Por medio del Ministerio de Salud ofrecer mayor información de esta ITS a jóvenes y adultos sexualmente activos, por ser una infección de fácil transmisión.

XIV. BIBLIOGRAFIA.

1. Conde C., Lazcano E., Hernández C., Juárez L., Smith JS., Hernández M. Seroprevalencia de la infección por el virus herpes simplex tipo 2 en tres grupos poblacionales de la Ciudad de México. Salud Pública de México 2003; vol. 45, suplemento 5, pag. 608-615.
2. Martínez MJ., Saavedra T., Ojeda JM., Suárez M. Identidad genómica entre virus herpes simplex aislados de lesiones glúteos y genitales. Rev. Chile. Infect. 1995; vol. 12, pag. 192-198.
3. Asociación Americana de Salud Social. Aspectos Epidemiológicos actuales de Herpes Genital; capítulo 1, pag. 3 -7.
4. Ribes J., Steele A., Seabolt J. and Baker D. Six Year Study of the Incidence of Herpes in Genital and Nongenital Cultures in a Central Kentucky Medical Center Patient Population. Journal of Clinical Microbiology 2001; pag. 3321-3325.
5. Martínez MJ., Saavedra T., Ojeda JM., Suárez M. Caracterización antigénica y genómica de virus Herpes simplex aislados de dobles infecciones genitales. Rev. Méd. Chile 1996; pag. 153-159.
6. Griffiths P. Virus herpes y Sida. Actualidad Clínica 1994; pag. 4-12.
7. www.tuotromedico.com/temas/herpes-genital.htm
8. Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G., Pfaller M. Virus herpes humanos. En: Microbiología Médica; Cuarta edición. España: Mosby; 2002, pag. 468-477

9. Sistema Nacional de Información en Salud SNIS – Bolivia. Casos sospechosos Reportados de úlcera genital – La Paz (ámbito urbano) 2002.
10. www.intapp.medscape.com/px/medlineapplgetdoc
11. Berría M. Familia Herpetoviridae. En: Virología Médica. Tercera edición. Buenos Aires: El Ateneo; 1998, pag. 327 - 332.
12. Handsfield H. Herpes genital. En: Enfermedades de Transmisión Sexual. Segunda edición. España: Marbán Libros, S.L.; 2002, pag. 77-93.
13. Asociación Americana de Salud Social. Pacientes con herpes genital; Capítulo 2, pag. 8 - 18.
14. Croen K., Ostrove J., Dragovic L., Smialek J. and Straus S. Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. The New England Journal of Medicine 1987; Volumen 317, número 23, pag. 1427 -1431.
15. www.niaid.nih.gov/publications/español/stdherp.htm. Herpes Genital. Marzo 2002
16. Rooney J.F., Felser J.M., Ostrove J.M. Acquisition of genital herpes from an asymptomatic sexual partner. The New England Journal of Medicine 1992; vol. 314, pag. 1561-1564
17. Pottaje JC., Kessler HA. Herpes Simplex Virus resistance to Acyclovir: Clinical Relevante. Infectious Agents and Disease 1995; vol 4, número 3, pag. 115 -123.

18. Mindel A. Herpes genital: "la epidemia olvidada". Actualidad Clínica 1994; pag. 39 - 51.
19. www.unizar.es/gine/ets301.htm. 2003. herpes genital.
20. Martínez J.M., Navarrete N., Santander E., Garmendia M.L., Gubelin W. Seroprevalencia de la infección por virus herpes simplex tipo 2 en pacientes atendidos en centros de referencia de ETS de Santiago. Rev. méd. Chile 2005; volumen 133, número 3.
21. Schultx R., Suárez M. Estudio comparativo de herpes genital en dos grupos de embarazadas. Revista Chilena de Infectología 1990; volumen 7, número 4, pag. 221 - 224.
22. Tilli M. Herpes genital y embarazo. DST – J bras Doenças Sex Transm 2004; vol. 16, pag. 48.52.
23. Clarke P. Actulidad Clínica. Los efectos psicosociales del herpes genital; pag13-23.
24. www.emedicine.com/med/topic3554.htm
25. www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2004/medicine/diagnóstico
26. Asociación Americana de Salud Social. Diagnóstico de infecciones por virus herpes simplex; apéndice 2, pag. 34-40.
27. Díaz F., Rubén M., Sacks S., Mac Pherson P. and Caissie G. Detección of Viral DNA to Evaluate outcome of Antiviral Treatment of Patients with recurrent Genital Herpes. Journal of Clinical Microbiology 1996; pag. 657-663.

28. Kourí V., Suárez C., Resik S., García S. Detección de herpes virus en pacientes inmunocomprometidos con meningoencefalitis, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Rev. Cubana Med. Trop 1998; vol. 50, número 3.
29. Liljequist J., Svennerholm B. and Bergstrom T. Typing of Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Isolates with Monoclonal Antibodies. Journal of Clinical Microbiology 1999; pag. 2717-2718.
30. Jáuregui L. Antivirales. En: Antimicrobianos: Uso terapéutico en Infectología Clínica. Primera Edición. La Paz: Plural Editores; 2002, pag. 403-426.
31. Kaye K. Infecciones por Virus Herpes. En: Manual Merck .Décima Edición; pag. 1300-1303
32. Chatis PA., Miller CH., Schragr LE. and Grumpacker CS. Successful treatment with foscarnet of an acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. The New England Journal of Medicine 1989; volumen 320, número 5, pag. 297-300.
33. Sasadeusz J. and Sacks S. Spontaneous reactivation of thymidine Kinase-Deficient, acyclovir-resistant Type 2 herpes simplex virus: Masked Heterogeneity or Reversion?. The journal of infectious Diseases 1996; pag. 476-482.
34. Sistema Nacional de Información en Salud SNIS – Bolivia. Casos sospechosos reportados de úlcera genital por centro de Salud. La Paz (ámbito urbano) 2002.

35. Ministerio de Salud y Previsión Social. Úlcera genital. En: Guía del Manejo Sindrómico de las infecciones de Transmisión Sexual 2001.
36. Nina A., Luchsinger V., Martínez MJ., Suarez M. Sensibilidad in vitro al aciclovir de virus herpes simplex aislado de pacientes con herpes genital recurrente. Revista Chilena Obstet. Ginecol 1997; pag. 275-280.
37. Pupo M., Hermida C., Morier L., Garcia S., Resik S. Anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen el Virus Herpes Simplex (VHS) y su posible aplicación al diagnóstico. Rev. Cubana Med. Trop. 1997; volumen 49, número 3, pag. 181-185.
38. Terceros P. Virus herpes simplex: aislamiento y cultivo viral in vitro. Trabajo de tesis. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas 2001.
39. Schmidt N., Emmons R. General principles of laboratory diagnostic methods. En: Diagnostic Procedure for viral Rickettsial and Chlamydial infections. Segunda. Edición. Washington DC; 1989, pag. 1-35.
40. Collins P. and Darby G. Laboratory Studies of herpes simplex virus strains resistant to acyclovir. Reviews Medical Virology 1991; volumen 1, pag. 19-27.
41. Englund J., Zimmerman M., Swierkosz E., Goodman J., Scholl D. and Balfour H. Herpes simplex Virus resistant to acyclovir. Annals of Internal Medicine 1990; pag. 416-422.
42. Velasco M., Saavedra T., Sepulveda C. y Suarez M. Tratamiento prolongado con aciclovir en Herpes genital recurrente. Respuesta

clínica virológica e inmunológica. Revista Médica de Chile 1991; pag. 876 - 880.

43. Monsalvo F., Estévez J., Costa L., Salas M., Hernández M., Olaya J., Rodríguez E. y Callejas D. Seroepidemiología del virus Herpes simplex 2 en una población indígena Yukpa. Estado Zulia. Venezuela. Revista Médica de Chile. 2001.
44. Camarena JJ. y Nogueira JM. Diagnóstico serológico de las infecciones por los virus herpes simplex. Valencia 2001.
45. Pérez JL., Navarro M., Gimeno C. y Mendoza J. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpes virus. 1995.
46. Dueñas A., Adam E., Melnick JL., and Rawls W.E., Herpes virus 2 in a prostitute population. Am .J. Epidemiol. 1995; pag. 483-485.
47. Bardeci D., Pena M.J., Bordón P., Aladro Y., González C. y Lafarga B. Utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de las infecciones herpéticas del sistema nervioso. Enfem. Infecc. Microbiol. Clin. 2004; vol. 22, pag. 150-155.
48. Hernández Sampieri R., Fernandez Collado C., Baptista P. Diseños no experimentales de investigación. En: Metodología de la investigación. Segunda Edición.
49. Doepker R., Hsu W., Saffran H. and Smiley J. Herpes Simplex Virus Virion host Shutoff Protein Is Stimulated by Translation Initiation Factors eIF4B and eIF4H. Journal of Virology 2003.

50. Schmelter J., Knez J., Smiley J. and Capone J. Identification and Characterization of a Small Modular Domain in the Herpes Simplex Virus host Shutoff Protein Sufficient for Interaction with Vp16. *Journal of Virology* 1996; pag. 2124-2131.

51. Steben M. Genital Herpes. The epidemiology and Control of a Common Sexually Transmitted Disease. *The Canadian Journal of Human Sexuality* 1997; volumen 6, número 2.

TABLAS

TABLA 1
NÚMERO TOTAL DE PACIENTES ATENDIDOS CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE
HERPES GENITAL SEGÚN SEXO Y OCUPACION

GRUPO	SEXO				TOTAL
	Femenino		Masculino		
	Nº	%	Nº	%	Nº
TSC	19	90,5	2	9,5	21 (25%)
Población general	10	15,6	54	84,4	64 (75%)
TOTAL	29	34	56	66	85

TABLA 2
PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE HERPES GENITAL SEGÚN
OCUPACIÓN Y EDAD DE INICIO DE ACTIVIDAD SEXUAL

GRUPO	EDAD INICIO DE ACTIVIDAD SEXUAL										Total
	13 años	14 años	15 años	16 años	17 años	18 años	19 años	20 años	21 años	32 años	
TSC (n)	2	3	7	5	1	2	1	0	0	0	21
PG (n)	2	5	16	7	6	20	2	3	2	1	64
TOTAL	4	8	23	12	7	22	3	3	2	1	85

TABLA 3
CORRELACION ENTRE CULTIVO CELULAR & IFI DE MUESTRAS OBTENIDAS
POR IMPREGANCIÓN DIRECTA EN PORTAOBJETOS PARA DIAGNÓSTICO DE
HERPES GENITAL

		CULTIVO CELULAR (CC)		Total
		CC positivo	CC negativo	
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	IFI positivo	21	6	27
	IFI negativo	1	44	45
Total		22	50	72

TABLA 4
CORRELACION ENTRE CULTIVO CELULAR & IFI DE SEDIMENTO DE
MUESTRAS OBTENIDAS EN MEDIO DE TRANSPORTE VIRAL PARA
DIAGNÓSTICO DE HERPES GENITAL

		CULTIVO CELULAR (CC)		Total
		CC positivo	CC negativo	
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	IFI positivo	22	5	27
	IFI negativo	3	42	45
Total		25	47	72

TABLA 5
FRECUENCIA DE HERPES GENITAL, SEGÚN OCUPACIÓN Y NIVEL DE INSTRUCCIÓN

NIVEL DE INSTRUCCION	P. GENERAL		T.S.C.	
Básico	2	12%	0	0%
Intermedio	3	18%	1	12,5%
Medio	8	47%	6	75%
Técnico	3	18%	0	0%
Universitario	1	5%	1	12,5%
TOTAL	17	100%	8	100%

TABLA 6
FRECUENCIA DE HERPES GENITAL, SEGÚN OCUPACIÓN Y EDAD DE INICIO DE LA ACTIVIDAD SEXUAL

GRUPO POBLACIONAL		EDAD DE INICIO DE LA ACTIVIDAD SEXUAL								
		14 años	15 años	16 años	17 años	18 años	19 años	20 años	21 años	TOTAL
TSC	Hombres	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	Mujeres	0	3	3	0	1	0	0	0	7
P. GENERAL	Hombres	1	2	2	1	6	0	1	1	14
	Mujeres	2	1	0	0	0	0	0	0	3
TOTAL		3	7	5	1	7	0	1	1	25

ANEXOS

ANEXO I

CASOS SOSPECHOSOS DE ULCERA GENITAL

LA PAZ (AMBITO URBANO – RURAL)

GESTION 2002

Establecimiento de salud	'Menor a 1'	'1 - 4'	'5- 14'	'15 - 59'	'60 y Mas'	Total
C.S. Achachicala	0	0	1	73	0	74
C.S. ACHUMANI	0	0	0	94	0	94
C.S. Agua DeLa Vida	0	0	2	13	1	16
C.S. ALTO IRPAVI	0	0	0	1	0	1
C.S. Alto Mcal.Santa Cruz	0	0	0	2	0	2
C.S. Alto Miraflores	0	0	1	41	0	42
C.S. Alto Miraflores Prosalud.	0	0	0	13	0	13
C.S. ALTO SEGUENCOMA	0	0	0	5	0	5
C.S. Bajo Tejar	0	0	0	2	0	2
C.S. Biblioteca	0	0	0	1	0	1
C.S. BOLOGNIA	0	0	0	21	0	21
C.S. C.I.E.S. La Paz	0	0	0	9	1	10
C.S. CEMEP	0	0	0	3	0	3
C.S. Cemse	0	0	0	57	0	57
C.S. Chasquipampa(E. Saenz)	0	0	0	6	0	6
C.S. Chuquiaguillo Prosalud	0	0	0	16	0	16
C.S. CIASE	0	0	0	3	0	3
C.S. Ciudadela Ferroviaria	0	0	0	6	0	6
C.S. COTA COTA (Los pinos)	0	3	2	57	1	63
C.S. DIVINO MAESTRO	0	0	0	1	0	1
C.S. El Calvario	0	0	0	15	0	15
C.S. IRPAVI-BOLOGNIA PROSALUD	0	0	0	8	0	8
C.S. IV CENTENARIO	0	0	0	3	0	3
C.S. Juancito Pinto	0	0	0	18	0	18
C.S. L.P. Nro 2 Emergencia	0	0	1	17	0	18
C.S. Las Lomas	0	0	0	2	0	2
C.S. Llojeta	0	0	0	32	0	32
C.S. M.I. BELLA VISTA	0	0	1	147	0	148
C.S. M.I. Pampahasi (BAJO)	0	0	0	6	0	6
C.S. M.I. EL TEJAR(MCAL.)	0	0	0	4	0	4
C.S. Munaypata	0	0	0	2	0	2
C.S. Normal SIMON BOLIVAR	0	0	0	1	0	1
C.S. OBRAJES	0	0	0	7	0	7

C.S. PACASA	0	0	0	1	0	1
CENTRO DE.SALUD PILOTO	0	0	0	229	0	229
C.S. Reten De Emergencia	0	0	0	11	0	11
C.S. RINCON PORTADA	0	0	0	2	0	2
C.S. Said	0	0	0	9	0	9
C.S. San Antonio Alto	0	0	0	2	0	2
C.S. San Antonio BAJO	0	0	1	8	1	10
C.S. San Francisco De Asis	0	0	0	45	0	45
C.S. San Francisco Panticirca	0	0	0	3	0	3
C.S. San Isidro	0	0	0	1	0	1
C.S. San Jose Natividad	0	0	0	2	0	2
C.S. San Juan Lazareto	0	0	0	34	0	34
C.S. San Pedro Bajo	0	0	0	36	0	36
C.S. Tacagua Bajo	0	0	0	3	0	3
C.S. Tejada Soriano Prosalud	0	0	0	8	1	9
C.S. Tembladerani	0	0	2	53	0	55
C.S. V.Victoria Prosalud	0	0	0	11	0	11
C.S. VALLE HERMOSO (E)	0	0	0	2	0	2
C.S. Villa Fatima Prosalud	0	0	0	6	0	6
C.S. VILLA VICTORIA	0	0	0	2	0	2
C.S. Vino Tinto	0	0	0	38	0	38
C.S. WIÑAY	0	0	0	4	0	4
C.S.M.I. Chamoco Chico	0	0	0	7	0	7
C.S.M.I. La Portada	0	0	0	17	0	17
Hospital De Clinicas	0	0	0	24	0	24
Hospital De La Mujer	0	0	0	17	0	17
Hospital Juan XXIII	0	5	1	55	1	62
Pol. 18 De Mayo en 21 De Sep	0	0	0	33	0	33
Pol. Manco Kapac	0	0	1	1	0	2
Pol. Miraflores	0	0	3	67	8	78
Pol. Villa Fatima	0	0	0	21	2	23
TOTAL	0	8	16	1438	16	1478

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El herpes genital es una infección de transmisión sexual (ITS), originada por los virus herpes simplex (VHS) tipo 1 y 2, los cuales además son responsables de diferentes patologías en el hombre, estimándose que cerca de un tercio de la población mundial estaría infectada con estos agentes. La infección genital herpética reviste especial importancia, por ser una ITS de alta prevalencia y por las complicaciones asociadas a ella, como son: la capacidad de persistencia y reactivación del virus, el riesgo de transmisión vertical de madre a hijo, su asociación con procesos neoplásicos y con la facilitación de la transmisión sexual de otros virus.

En Bolivia, se carece de información acerca de la prevalencia de esta enfermedad debido a que no se dispone de un diagnóstico de laboratorio que confirme la sospecha clínica.

Con estos antecedentes el estudio tiene como objetivo principal determinar la frecuencia de la infección por el virus herpes simplex, en trabajadoras sexuales y población general, de ambos sexos, estudio a realizarse en el Centro Piloto de la ciudad de La Paz, para obtener datos que permitan elaborar programas de prevención. Adicionalmente, se completará el estudio para conocer los tipos antigénicos; y la sensibilidad de los virus herpes simplex al aciclovir.

Para realizar este estudio se solicita la autorización para la toma de una muestra de secreción de la lesión genital con un hisopo de algodón estéril, este procedimiento no afecta la salud de la persona y menos puede tener efectos colaterales. Por otra parte la muestra será tomada bajo las normas estrictas de Bioseguridad universales empleando material desechable para cada paciente. La muestra obtenida será utilizada exclusivamente para efectuar pruebas laboratoriales de cultivo celular para aislar al Virus Herpes Simplex, e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El protocolo de estudio debe consignar datos generales sobre la persona que participa en el estudio, resumido en una historia clínica, información que tiene carácter estricto de confidencialidad y con fines relacionados en forma exclusiva para este estudio.

Finalmente, los exámenes laboratoriales descritos anteriormente serán gratuitos y los resultados estarán a disposición de cada persona, sin costo alguno. Al tener pleno conocimiento de los alcances de este proyecto acepto voluntariamente participar en este estudio.

NOMBRE _____

FIRMA _____

FECHA _____

El firmante es:

Sujeto Testigo Parentesco _____

ANEXO III

FICHA CLINICO EPIDEMIOLOGICO
ESTUDIO DE PREVALENCIA DE VIRUS HERPES SIMPLEX

CODIGO DE LAB.: _____

PRIMERA CONSULTA

RECONSULTA

DATOS GENERALES:

INSTITUCION: CENTRO PILOTO

No. HISTORIA CLINICA: _____ FECHA: _____

NOMBRE COMPLETO: _____ EDAD: _____

LUGAR DE RESIDENCIA (últimos 3 años): _____

Ciudad/localidad: _____ Barrio/Zona: _____ No. Teléfono: _____

OCUPACION: _____ SEXO: _____

NIVEL DE INSTRUCCIÓN:

Ninguna Básica Intermedio Medio Técnico Universitario

DATOS CLINICOS:

Paridad: _____ Edad inicio de actividad sexual: _____ No. Parejas sexuales: _____

DIAGNOSTICO CLINICO:

- Vesículas o ampollas en:

Genitales externos

Vagina

Cérvix

Peri anal

Muslos

- Ulceras en:

Genitales externos

Vagina

Cérvix

Peri anal

Muslos

Síntomas:

Fiebre

Dolor

Ardor

Escozor

Otros _____

Fecha de inicio de síntomas y signos del episodio actual: _____

Antecedentes de episodios previos: SI NO

¿Cuántas veces al año? _____

¿Cuándo fue la última vez? _____

Antecedentes de tratamiento:

Aciclovir oral Fecha del último tratamiento _____

Aciclovir tópico Fecha del último tratamiento _____

Otros antivirales Especificar ¿Cuál? _____

Antecedentes de inmunosupresión:

VIH-SIDA

Cáncer

Otras: _____

Antecedentes de otras I.T.S.

NO

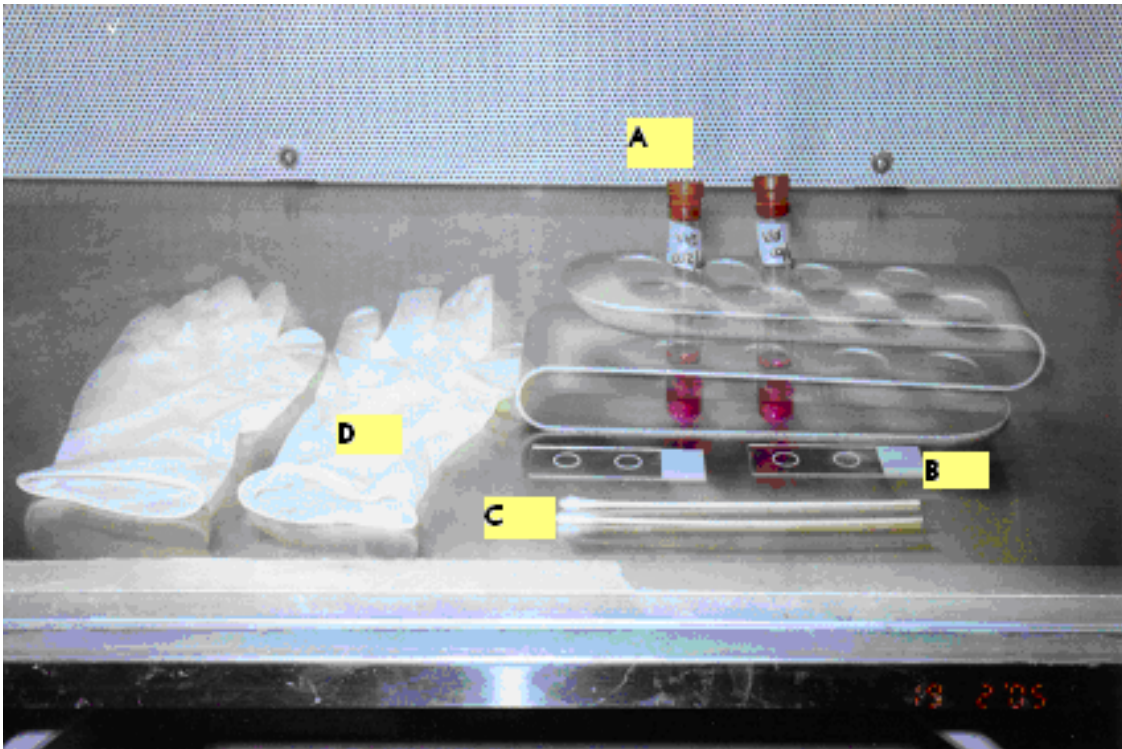
SI

¿Cuales? : _____

OBSERVACIONES: _____

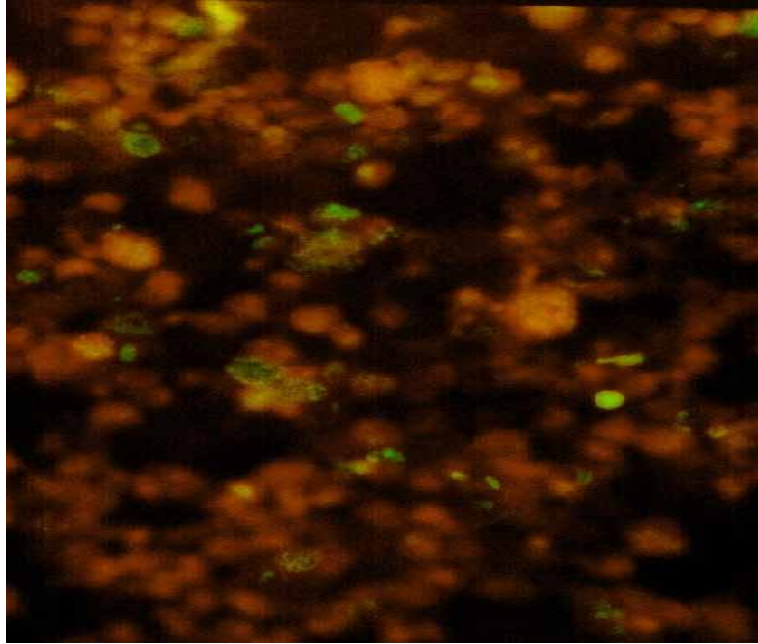
FIRMA DEL MEDICO: _____

ANEXO IV

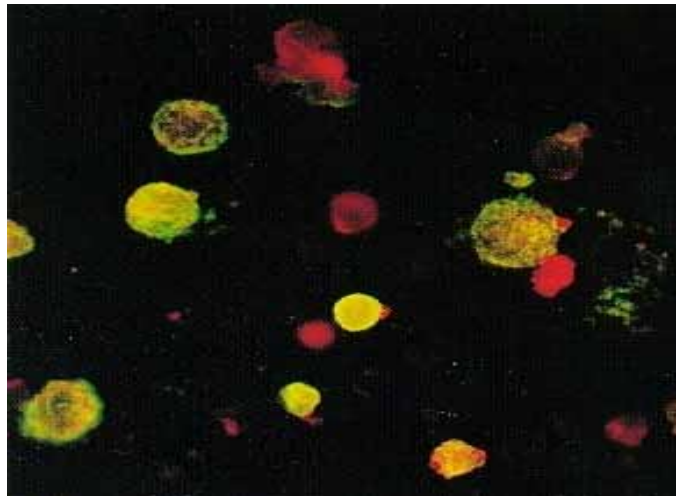


Material para toma de muestra: A= Medio de Transporte Viral, B= Placas con dos anillos, C= hisopos estériles, D= guantes descartables.

ANEXO V



Observación microscópica de Virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), (microscopio de fluorescencia objetivo 20X)

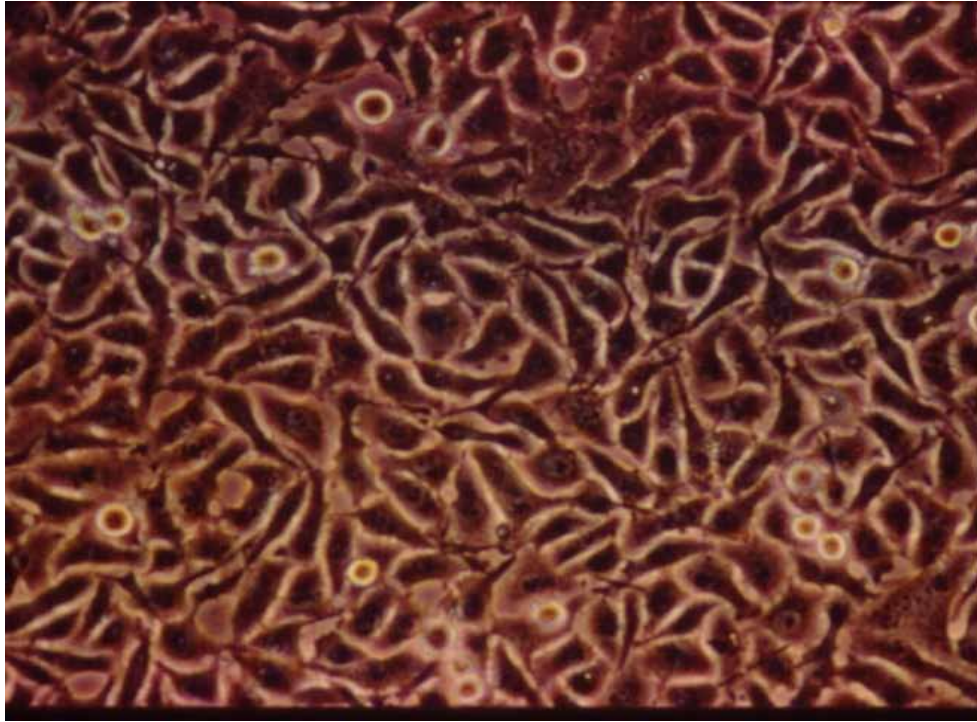


Observación microscópica de Virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2), (microscopio de fluorescencia objetivo 40X)

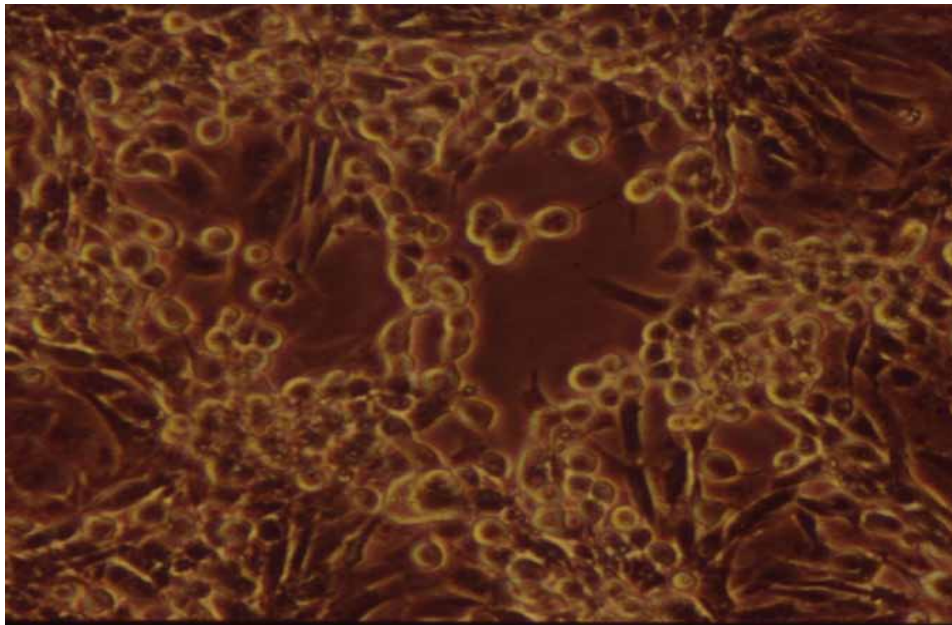
ANEXO VI



Botellas de cultivo celular con monocapas confluentes de células VERO con medio E-MEM de mantenimiento

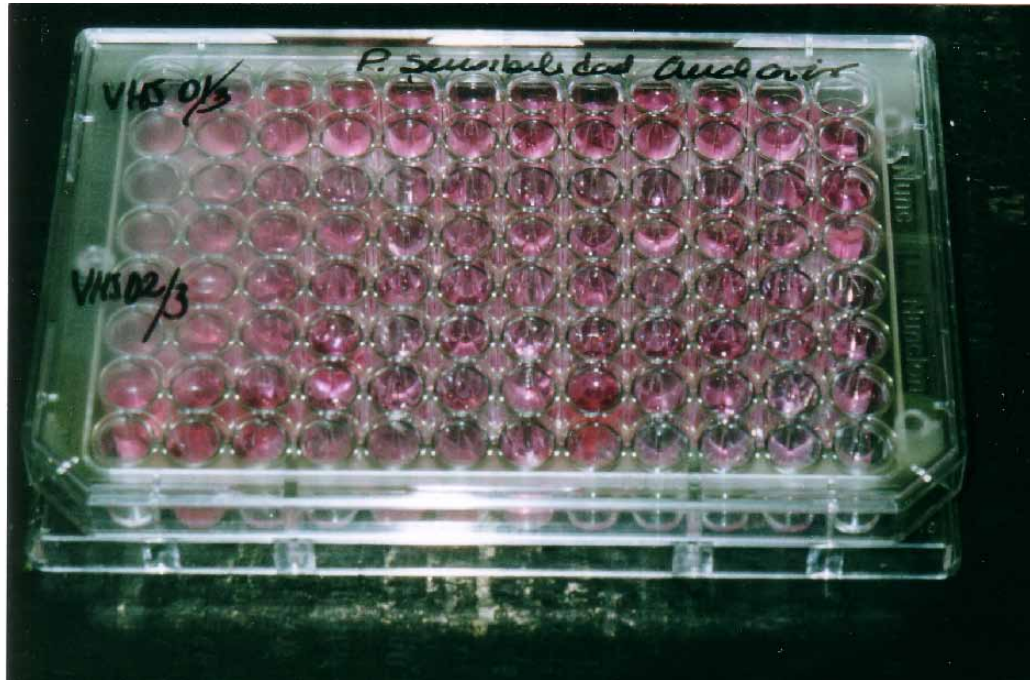


Monocapa de células VERO sano



Monocapa de células Vero infectadas con VHS con Efecto Citopático (ECP)

ANEXO VII



Prueba de sensibilidad al aciclovir, en microplacas estériles con monocapas confluentes de células VERO

