

## ANTICUERPOS FIJADORES DE COMPLEMENTO EN SUEROS DE COBAYOS INMUNIZADOS CON ANTIGENOS DE VIRUS HERPES HOMINIS TIPO 2 (MS)

Hugo Machado Paz\*

### RESUMEN

Se prepararon antígenos de cubierta y de cápsido, y antígenos crudo y crudo tratado con éter, a partir de virus Herpes hominis tipo 2 (MS), el cual creció en cultivos celulares. El material fue utilizado como antígeno inmunizante en cobayos.

El estudio serológico por fijación del complemento indica que los antígenos de cubierta y cápsido muestran mayor especificidad de tipo que los dos últimos, cuando se utilizan cantidades sub-óptimas de antígeno en la prueba. La respuesta en los inmunizados con antígenos crudo y crudo tratado con éter, evidencia también la reactividad cruzada de los dos tipos.

### INTRODUCCION

Son conocidas las dificultades que existen en la preparación de un buen antígeno fijador del complemento a partir de virus Herpes simple tipo 2 (9), y de los problemas que se presentan para hacer el diagnóstico serológico de la enfermedad producida por el citado virus, puesto que comparte antígenos comunes con el tipo 1 (7).

Fazekas de St. Groth en 1961 (3) propuso la diferenciación de las cepas por medio de la neutralización cinética en cultivos celulares; procedimiento que fue luego aplicado a microtécnicas por Pauls y Dowdle (10). En 1969, Figueroa y Rawls (4) establecieron algunos marcadores biológicos que diferenciaban la cepa oral de la cepa genital. Luego Nahmias y col (8) desarrollaron una técnica de inmunofluorescencia para diferenciar entre ambos herpes. De igual manera Bernstein y Stewart (1) utilizaron la inhibición de la hemaglutinación indirecta como medio de diferenciación entre ambos. Con excepción del último de los métodos, todos poseen desventajas que los hacen de difícil realización.

\* *Cátedra de Virología, Escuela de Bionálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.*

Este trabajo presenta los resultados obtenidos utilizando diferentes antígenos herpéticos en la búsqueda de sueros inmunes específicos, y trata de caracterizar la antigenicidad parcial y la reactividad cruzada de los virus Herpes hominis.

## MATERIAL Y METODO

**Virus:** Las cepas de virus Herpes hominis tipo 1 (VR) y tipo 2 (MS) usadas para preparar los antígenos fueron obtenidas de John A Stewart (Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA).

**Propagación del virus:** Las cepas crecieron en botellas de 32 onzas de cultivo de células de fibroblastos de pulmón embrionario humano (HELFI). El medio nutritivo consistió de medio de Eagle modificado (5), con 10% de suero fetal de ternera. El mismo medio, pero con 2% de suero, fue usado para la propagación del virus. Los cultivos fueron inoculados con  $0.5 \times 10^5$  DICT 50 (dosis infecciosas medias en cultivos) de cada virus, diluidas en 4.5 ml de medio, e incubadas para absorción durante 45 minutos a 35°C. Posteriormente se le agregaron 45 ml de medio y se incubaron a la misma temperatura durante 66 horas, cuando el efecto citopatogénico (ECP) fue de 80 a 90%.

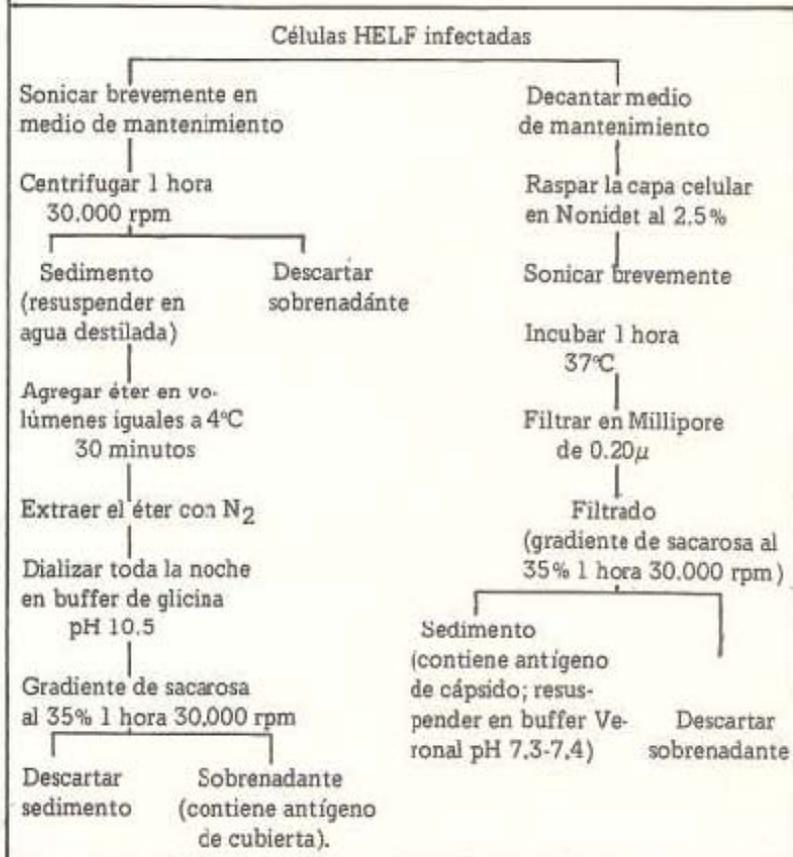
**Antígenos:** Los antígenos fijadores del complemento de cubierta y de cápsido fueron preparados según la técnica de Martin, Palmer y Kissling (6) (Fig. 1).

Los antígenos crudos fueron preparados de la siguiente manera: las capas celulares fueron lavadas con PBS a pH 7.2, con una concentración final de 0.15M NaCl y 0.01M  $PO_4$ ; luego se congelaron a  $-70^\circ C$  durante 15 minutos y se descongelaron a temperatura ambiente. Extraído el PBS se le agregaron 3.5ml de buffer de glicina-hidróxido de sodio 0.05M pH 9.0; se congelaron y se descongelaron por tres veces consecutivas, y la capa celular fue raspada de la pared de las botellas de cultivo, haciéndose posteriormente la extracción de esa suspensión. Esta fue sonicada durante 10 segundos a 25W con un sonicador Modelo W185 (Heat Systems-Ultrasonics Inc, Plainview, NY, USA). El material fue clarificado por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Parte de éste fue inactivado con volúmenes iguales de éter a  $4^\circ C$  durante 30 minutos. El éter fue extraído con gas nitrógeno en frío. Los antígenos crudos de VR y MS, al igual que los antisueros humanos positivos y negativos fueron obtenidos de John A Stewart, para la realización de las pruebas de fijación del complemento.

El antígeno normal fue preparado de la misma manera que el antígeno crudo, pero en cultivos celulares no inoculados con virus.

FIGURA 1

PREPARACION DE ANTIGENOS DE CUBIERTA Y CAPSIDO VIRAL



**Antiserosos de animales.**- Fueron preparados con antígenos de virus Herpes tipo 2 (MS), utilizando cobayos blancos de peso entre 300 y 400 g, según el esquema siguiente:

**Grupo I** (Cobayos N° 1 al 4): 0.5 ml de antígeno de cubierta mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, via intramuscular.

**Grupo II** (Cobayos N° 5 al 8): 0.5 ml de antígeno de cápsido mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, via intramuscular.

**Grupo III** (Cobayos N° 9 al 12): 0.5 ml de antígeno crudo mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, via intramuscular.

**Grupo IV** (Cobayos N° 13 al 16): 0.5 ml de antígeno crudo inactivado con éter, mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, via intramuscular.

**Grupo V** (Cobayos N° 17 al 20): 0.5 ml de HELF mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, via intramuscular. Control.

**Grupo VI** (Cobayos N° 21 al 24): No inoculados. Control.

Todos los cobayos fueron sangrados previamente antes de ser inoculados. Posteriores extracciones de sangre se efectuaron a los 9, 16 y 30 días después de inmunizados.

**Prueba de Fijación del Complemento:** Se usó la microtécnica del LBCF (2).

## RESULTADOS

Se detectaron niveles bajos de anticuerpos fijadores del complemento (1:8) contra Herpes tipo 1 (VR) y tipo 2 (MS), al 9° día de la inoculación, en los grupos inmunizados con antígeno de cubierta y antígeno de cápsido, y títulos ligeramente mayores (1:16 a 1:64) en los inoculados con antígenos crudo y crudo inactivado con éter. Los títulos de anticuerpos fijadores del complemento se elevaron progresivamente en los cuatro primeros grupos (1:256 a 1:1024), especialmente a los 30 días, con valores prácticamente iguales para los dos virus. Los grupos controles no presentaron anticuerpos fijadores del complemento en ningún momento.

Cuando los sueros anti MS, preparados según el esquema anterior, fueron probados contra concentraciones óptimas de antígenos crudos de los tipos VR y MS del virus Herpes (diluciones de 1:3), presentaron títulos similares de anticuerpos (Tabla I). Sin embargo, en los cobayos inoculados con antígeno de cubierta y en los inoculados con antígeno de cápsido, cuando las concentraciones de antígenos usadas en la prueba eran una o dos veces mas bajas, los anticuerpos para el tipo 2 continuaban siendo demostrables (Tabla II), cosa que no sucedía con los anticuerpos contra el tipo 1 (Tabla III). En la tabla IV se detallan los títulos obtenidos contra Herpes 1 y Herpes 2 utilizando antígenos mas diluídos.

Los cobayos inmunizados con antígeno crudo y antígeno crudo tratado con éter, presentaron anticuerpos contra ambos virus, utilizando cualquier dilución de antígeno en la prueba.

TABLA I  
TÍTULOS DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO CONTRA HERPES  
1 y 2 EN SUEROS DE COBAYOS INMUNIZADOS CON HERPES SIMPLE TIPO 2

Grupo y Nº del suero	Títulos contra Herpes 1 (VR Dil. 1:3)				Títulos contra Herpes 2 (MS Dil. 1:3)				
	Días	0	9	16	30	0	9	16	30
GRUPO I									
2		<8	8	64	512	<8	<8	64	256
3		<8	8	128	1024	<8	<8	128	256
4		<8	8	128	1024	<8	<8	128	128
GRUPO II									
5		<8	8	128	1024	<8	<8	512	1024
6		<8	<8	64	512	<8	<8	128	512
7		<8	<8	<8	512	<8	<8	64	256
8		<8	8	<8	1024	<8	<8	128	1024
GRUPO III									
9		<8	16	256	1024	<8	32	512	1024
10		<8	32	256	512	<8	32	256	512
11		<8	32	512	1024	<8	32	512	1024
12		<8	8	128	-	<8	32	128	-
GRUPO IV									
13		<8	8	128	-	<8	8	128	-
14		<8	64	512	1024	<8	64	256	512
15		<8	64	1024	1024	<8	32	1024	1024
16		<8	8	512	1024	<8	8	512	512

## DISCUSION

La dificultad de hacer el diagnóstico entre Herpes 1 y 2 a partir de un aislamiento se debe, primordialmente, a la reactividad cruzada que presentan los sueros inmunes preparados con cualquiera de los dos virus.

La utilización de fracciones del virus, sobre todo del cápsido, produce un suero inmune con menor tendencia a reaccionar con el virus heterólogo en la prueba de fijación del complemento, que los sueros inmunes preparados por la inoculación de antígeno crudo y crudo inactivado con éter; sobre todo si se utilizan en la prueba diluciones menos concentradas de antígeno viral.

Esta modificación nos dá un instrumento sencillo para identificar con certeza el serotipo de los virus herpes aislados.

TABLA II		
TÍTULOS DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO CONTRA VIRUS HERPES 2 EN SUEROS DE COBAYOS INMUNIZADOS CON HERPES SIMPLE TIPO 2. COMPARACION DE DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIGEN		
Grupo y Nº del suero	Títulos contra Herpes 2 (MS Dil. 1:3) Día 30	Títulos contra Herpes 2 (MS Dil. 1:4) Día 30
GRUPO I		
2	256	128
3	256	256
4	128	128
GRUPO II		
5	1024	1024
6	512	512
7	256	512
8	1024	1024
GRUPO III		
9	1024	1024
10	512	512
11	1024	1024
12	-	-
GRUPO IV		
13	-	-
14	512	512
15	1024	1024
16	512	512

**Complement-fixing antibodies in guinea pigs immunized with type 2 (MS) Herpes virus hominis antigens.**

Machado-Paz H (Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela). *Invest Clin* 14(2): 74-81, 1973.— Different herpes virus type 2 antigens were prepared using either virus membranes, capsid, crude whole virus or crude virus treated with ether. The virus was grown in tissue culture and immune serum was obtained by inoculation of antigens into guinea pigs.

Complement fixation test showed that antibodies against virus membrane and capsid were more type specific than antibodies obtained with crude virus and ether inactivated virus, when the amount of virus antigens used in the test were decreased below optimal figures. Antibodies prepared with the last two antigens cross-reacted with herpes 1 at any dilution used.

TABLA III		
TÍTULOS DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO CONTRA VIRUS HERPES EN SUEROS DE COBAYOS INMUNIZADOS CON HERPES SIMPLE TIPO 2. COMPARACION DE DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIGENO.		
Grupo y Nº del suero	Títulos contra Herpes 1 (VR dil. 1:3) Día 30	Títulos contra Herpes 1 (VR Dil. 1:4) Día 30
GRUPO I		
2	512	32
3	1024	8
4	1024	8
GRUPO II		
5	1024	8
6	512	<8
7	512	<8
8	1924	8
GRUPO III		
9	1024	512
10	512	256
11	1024	512
12	-	-
GRUPO IV		
13	-	-
14	1024	256
15	1024	512
16	1024	64

TABLA IV		
COMPARACION DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO CONTRA VIRUS HERPES 1 y 2 EN SUEROS DE COBAYOS INMUNIZADOS CON HERPES SIMPLE TIPO 2. UTI- LIZANDO DOSIS SUB-OPTIMA DE ANTIGENOS.		
Grupo y Nº del suero	Títulos contra Herpes 2 (MS Dil. 1:4) Día 30	Títulos contra Herpes 1 (VR Dil. 1:4) Día 30
GRUPO I		
2	128	32
3	256	8
4	128	8
GRUPO II		
5	1024	8
6	512	<8
7	512	8
8	1024	8
GRUPO III		
9	1024	512
10	512	256
11	1024	512
12	-	-
GRUPO IV		
13	-	-
14	512	256
15	1024	512
16	512	64

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BERNSTEIN MT, STEWART JA: Method for typing antisera to Herpes hominis by indirect hemagglutination inhibition. *App. Microbiol* 21: 680-684, 1971.
  - 2- CASEY HL: Part II. Adaptation of LBCF method to microtechnique. In *Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to microtest*. Public Health Monograph N° 74, Public Health Service publication N° 1228, US Government Printing Office, Washington, DC, 1965.
  - 3- FAZEKAS DE ST GROTH S: Evaluation of quantal neutralization tests. *Nature* 191: 891-893, 1961.
  - 4- FIGUEROA ME, RAWLS WE: Biological markers for differentiation of Herpes virus strains of oral and genital origin. *J. gen Virol* 4: 259-267, 1969.
  - 5- KISSLING RE, REESE DR: Antirabies vaccine of tissue culture origin. *J Immunol* 91: 362-368, 1963.
  - 6- MARTIN ML, PALMER EL, KISSLING RE: Complement-fixing antigens of Herpes simplex virus types 1 and 2: Reactivity of capsid, envelope and soluble antigens. *Infect Immun* (Feb): 248-254, 1972.
  - 7- NAHMIAS AJ, DOWDLE WR: Antigenic and biologic differences in Herpesvirus hominis. *Prog Med Virol* 10: 110-159, 1968.
  - 8- NAHMIAS AJ, DELBUONO I, PIPKIN J, HUTTON R, WICKLIFFE C: Rapid identification and typing of Herpes simplex virus types 1 and 2 by a direct immunofluorescence technique. *App Microbiol* 22: 455-458, 1971.
  - 9- PALMER EL, MARTIN ML, WARFIELD DT: Preparation of type 2 Herpes simplex virus complement-fixing antigen. *App Microbiol* 22: 925-927, 1971.
  - 10- PAULS FP, DCWDLE WR: A serologic study of Herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. *Immunol* 98: 941-947, 1967.
-