UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ

CODIRECTORES:

DRA. DAYANA NICTÉ VERGARA ORTEGA

DRA. ANTONIA HERRERA ORTÍZ

CUERNAVACA, MORELOS **OCTUBRE, 2020**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de tesis, la Dra. Dayana Nicté Vergara Ortega y a la Dra. Antonia Herrera Ortíz, por su apoyo, consejos y conocimientos a lo largo de todo este proyecto, que sin su ayuda no hubiera sido posible.

También quiero agradecer a la M. en C. María Leonidez Olamendi Portugal, a la Técnica Laboratorista Santa García Cisneros y al Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán que conforman el equipo del Laboratorio de Serología e Infecciones de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Salud Pública, por sus recomendaciones, conocimientos y el espacio que me brindaron en el laboratorio, fueron parte fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Por ultimo quiero agradecer a mis compañeras y amigas Laura Dector, Lesslie Villa, Regina Hurtado, Gabriela flores, Martha E. Espín a mi novio J. Yael Velázquez y a mi familia por apoyarme, dándome palabras de aliento cuando mi ánimo decaía y acompañándome a lo largo de todo este proceso. En especial quiero hacer mención a mis padres María y Glicerio, a mi hermanos, Susi y Miguel que siempre estuvieron apoyándome en todo lo que necesitaba y fueron mi principal motivación para llegar hasta aquí.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN VI
1. MARCO TEÓRICO 1
1.1 Familia *Herpesviridae*. 1
1.2 Estructura viral de HSV-2..... 3
1.3 Ciclo de replicación viral. 4
1.4 Transmisión. 8
1.5 Manifestaciones clínicas. 10
1.6 Diagnóstico. 12
1.7 Tratamiento. 16
1.8 Epidemiología. 17
2. JUSTIFICACIÓN 20
3. HIPÓTESIS 21
4. OBJETIVO GENERAL 21
4.1 Objetivos específicos. 21
5. METODOLOGÍA 22
5.1 Población de estudio: estudio primario. 23
5.2 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). 23
5.3 Western blot antiHSV-1 / HSV-2. 24
5.4 Cálculo de la seroprevalencia del HSV-2. 26
5.5 Extracción y purificación de DNA. 26
5.6 PCR punto final para la amplificación de HSV-2. 27
5.7 PCR en tiempo real para la amplificación de HSV-2 (151pb). 29
5.8 Cálculo de la prevalencia de diseminación de HSV-2. 29
6. RESULTADOS 29
6.1 Descripción de la población. 29
6.2 Detección de anticuerpos anti HSV-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas. 30
6.3 Distribución de frecuencias de la razón de absorbancia (ELISA)..... 32
6.4 Confirmación de las muestras indeterminadas mediante Western blot. 33
6.5 Seroprevalencia de HSV-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas. 34
6.6 Estandarización de PCR tiempo real de HSV-2. 36

6.7 Determinación de diseminación de VHS-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas. 37
6.8 Prevalencia de diseminación genital entre las mujeres positivas a HSV-2 por serología. 39
6.9 Prevalencia de diseminación genital en el total de la población. 39
7. DISCUSIÓN. 40
8. LIMITACIONES. 44
9. CONCLUSIONES 44
10. RECOMENDACIONES 45
11. REFERENCIAS 46

FIGURAS

Figura 1 Genoma de HSV-2 3
Figura 2 Estructura característica de los Herpesvirus 4
Figuras 3 Ciclo de replicación viral del HSV-2 6
Figura 4 Infección primaria y reactivación de HSV-2, y su relación con las manifestaciones clínicas 7
Figura 5 Sitios de infección de los Herpesvirus y las enfermedades relacionadas ... 10
Figura 6 Duración de la excreción viral y evolución de las lesiones herpéticas 11
Figura 7 Efecto citopático característico del HSV-2 en células MRC-5. 15
Figura 8 Gráficas de la incidencia de herpes genital en mujeres por cada 100, 000 habitantes en México 19
Figura 9 Estrategia experimental general desarrollada en el proyecto 22
Figura 10 Tira control de western blot. 25
Figura 11 Amplicón de HSV-2 de 151 pb 27
Figura 12 Grafica de la razón de absorbancia 32
Figura 13 Tiras de western blot procesadas con suero de mujeres embarazadas 34
Figura 14 Gel de agarosa al 2% con productos de HSV-2 DE 151 pb. 36
Figura. 16 Amplificación de HSV-2 por PCR en tiempo real de muestras provenientes de mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas 38

TABLAS

Tabla 1 Familia viral 2
Tabla 2 Características de los primers F1qVHS2 y R2qVHS2 28
Tabla 3 Descripción de la población de primera visita 30
Tabla 4 Resultados positivos de las muestras de primera visita 31
Tabla 5 Confirmación de estatus de las muestras indeterminadas 33

INTRODUCCIÓN

El Virus del Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2, del inglés herpes simplex virus type 2) es un virus pertenece a la familia *Herpesviridae*, esta familia se caracteriza por ser una de las familias virales más importantes, ya que posee un gran número de patógenos y un amplio intervalo de hospederos (Sharma, Mobeen, & Prakash, 2016).

El HSV-2 es causante de la infección de transmisión sexual (ITS) conocida como herpes genital, esta ocasiona vesículas en zona genital que posteriormente evolucionan a úlceras húmedas, generalmente durante estas manifestaciones clínicas ocurre la diseminación, es decir la propagación del virus de HSV-2, sin embargo, aún en ausencia de úlceras, el virus puede diseminarse cuando el hospedero tiene un sistema inmunológico deprimido (Jaishankar & Shukla, 2016).

Al igual que la mayoría de las ITS, la infección por HSV-2 es asintomática hasta en un 80% de los casos, (Herrera et al., 2013). Uno de los factores de riesgo para la adquisición de HSV-2 es el sexo femenino (Baquero et al., 2018), además, las mujeres jóvenes tienen un mayor riesgo debido a la inmadurez genital (Shafii & Burstein, 2009).

El HSV-2 también puede ser transmitido de manera vertical, de la madre al recién nacido durante el parto, causando herpes neonatal, el cual puede producir discapacidad neurológica persistente e incluso la muerte. El riesgo de herpes neonatal es mayor cuando la madre ha contraído la primera infección al final del embarazo. Las mujeres con herpes genital antes del embarazo tienen un riesgo mucho menor de transmitir el virus a sus hijos (Baquero et al., 2018). En México, la prevalencia de HSV-2 en población general se ha estimado entre 18.2% al 29.8% (Gayet, 2015); sin embargo, en el estado de Morelos no existen reportes epidemiológicos de la población adolescente infectada con HSV-2.

1. MARCO TEÓRICO

El Virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2) pertenece a la subfamilia *alfaherpesvirinae* y es considerado uno de los patógenos de humanos más comunes entre los herpesvirus. Generalmente causa infecciones genitales y puede transmitirse de madres infectadas a recién nacidos (R. J. Whitley & Roizman, 2001). Sin embargo, esta infección es asintomática en aproximadamente el 80% de los casos (Herrera et al., 2013).

1.1 Familia Herpesviridae.

La familia *Herpesviridae* tiene como único género a Herpesvirus y tienen en común que poseen las siguientes características:

- Morfología típica: una cápside icosaédrica de 162 capsómeros recubiertos de una envoltura viral.
- Genoma que comprende una única molécula de DNA, de 120 a 250 Kb.
- La fase productiva de la infección, el virus comienza un ciclo lítico, se multiplica y se liberan múltiples partículas virales, durante este proceso la célula se rompe, lo que permite al virus infectar otras células y continuar con una fase de latencia en la cual el genoma viral permanece dentro de las células del hospedero durante toda su vida. De forma ocasional los Herpesvirus en estado latente pueden sufrir procesos de reactivación y dar lugar nuevamente a una fase productiva (Bascones & Pousa, 2011).

La familia viral tiene una estimación de origen de 180 a 220 millones de años atrás, y por lo menos 8 especies de esta infectan a humanos. Sus miembros se han clasificado en tres subfamilias (*alfaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* y *gammaherpesvirinae*), con

base en características biológicas y atributos genómicos ver tabla 1 (Sharma et al., 2016).

Familia *Herpesviridae*			
Subfamilia	**Especie**	**Enfermedad relacionada**	**Tropismo celular**
Alfaherpesvirinae	Virus del Herpes Simplex tipo 1 o HSV-1	Encefalitis	Neurotrópicos
	Virus del Herpes Simplex tipo 2 o HSV-2	Herpes genital, meningitis aséptica y radiculopatías recurrentes	
	Virus de la Varicella zoster o VZV	Varicela (*Varicella*)	
Betaherpesvirinae	Citomegalovirus o CMV	Infección congénita, microcefalia, convulsiones, hipotonía, espasticidad, síndrome de Guillain-Barre, plexopatía branquial aguda	Linfotrópicos
	Virus del Herpes tipo 6 (HHV6)	Roséola, convulsiones febriles y hepatitis fulminante	
	Virus del Herpes tipo 7 (HHV7)	Encefalitis	
Gammaherpesvirinae	Virus de Epstein-Barr o EBV	Meningitis aséptica, encefalomieloneuritis y neuritis	
	Virus del Sarcoma de Kaposi (HHV8)	Sarcoma de Kaposi	

Tabla 1 Familia viral (Bascones & Pousa, 2011; Sharma et al., 2016). Subfamilias de los herpes virus y representantes más importantes de cada una de ellas, así como las enfermedades que producen en los humanos.

1.2 Estructura viral de HSV-2.

El genoma del HSV-2 está compuesto por una cadena larga de DNA bicatenario de 152 Kb, el cual contiene al menos 74 genes (Ver figura 1, rectángulos negros) (Unemo et al., 2013). El genoma se compone de dos segmentos unidos covalentemente: la secuencia única larga (UL) y la secuencia única corta (US) (Figura 1). Cada segmento está flanqueado por secuencias repetidas invertidas, las que delimitan a UL son TRL e IRL y las de US son IRS y TRS (Burrel et al., 2017).

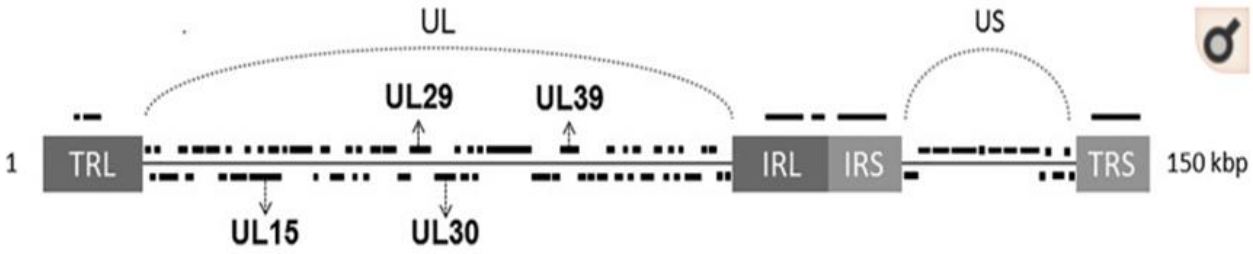


Figura 1 Genoma de HSV-2 (Burrel et al., 2017). El genoma del virus está constituido por 152 kb, y en la figura se representan los sitios genómicos importantes (ver texto).

El genoma del virus está contenido en una cápside icosaédrica, un tegumento formado por una capa amorfa de proteínas que rodean la cápside y una envoltura lipídica. En la envoltura lipídica, una de sus principales glicoproteínas es la gG2 por ser un distintivo entre el HSV-2 y el HSV-1 (Figura 2).

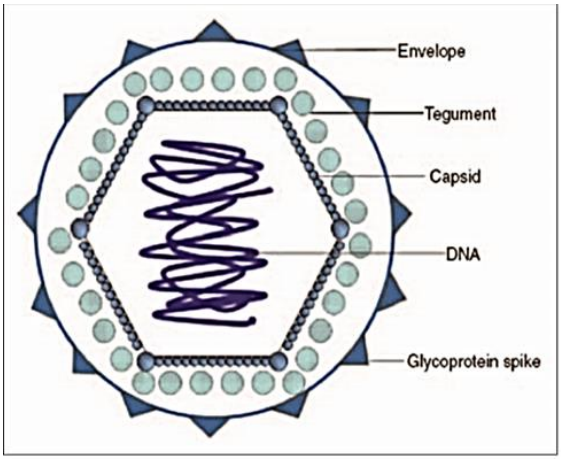


Figura 2 Estructura característica de los Herpesvirus (Bascones & Pousa, 2011). Virus de DNA bicatenario, protegido por una cápside, posee un tegumento, envoltura de lipídica y picos de glicoproteína.

1.3 Ciclo de replicación viral.

La adquisición del HSV-2 suele ser consecuencia de la transmisión por contacto genital. El virus se replica en el área genital, perigenital o anal; además puede migrar a las neuronas del ganglio sacro y establecer latencia. El virus debe entrar en contacto con superficies mucosas o con piel erosionada para que se inicie la infección (Bascones & Pousa, 2011).

El ciclo de replicación se puede dividir en fases:

i) Fase de entrada: la infección inicia con la unión del virus a la superficie celular y la fusión con la membrana plasmática. La unión a la superficie celular tiene lugar a través de receptores celulares específicos, el HSV-2 reconoce y se adhiere al proteoglicano heparán sulfato a través de glicoproteínas en la envoltura viral tales como gB y gC, en la superficie de la célula (Bascones & Pousa, 2011; Jaishankar & Shukla, 2016).

La penetración de la cápside viral puede ocurrir por fusión de la envoltura con la membrana plasmática o por endocitosis de viriones envueltos con la fusión final de la envoltura con una membrana vesicular. Se requiere de la glicoproteína gD en la envoltura del virus a través de su interacción con uno de los receptores: mediador de entrada de herpesvirus (HVEM) o nectina-1 y 2. En el citoplasma, la cápside viaja al núcleo donde se libera el DNA viral (Bascones & Pousa, 2011; Jaishankar & Shukla, 2016).

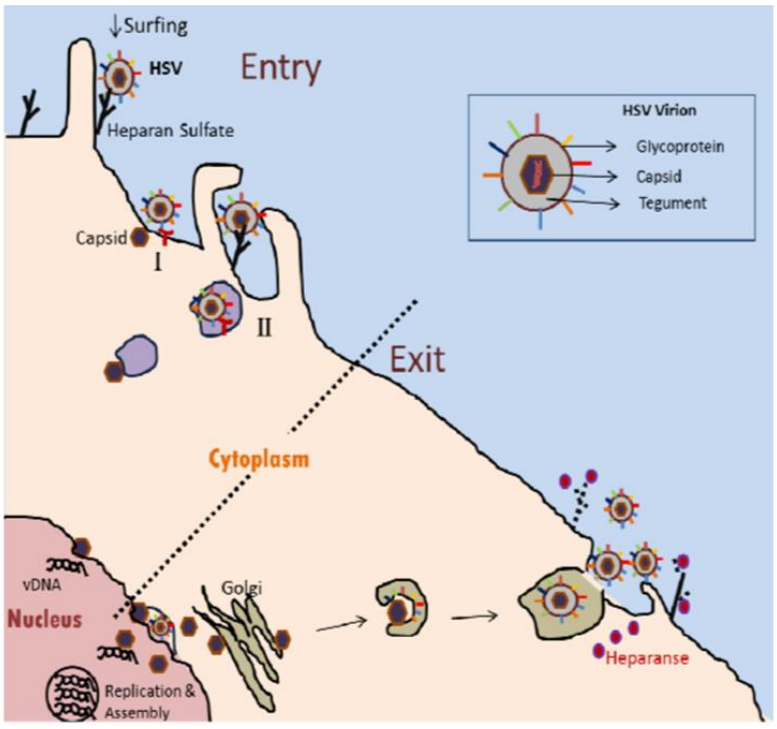
ii) Fase de expresión de genes: existen otros componentes del virus implicado en el desarrollo de la infección, por ejemplo, los codificados por UL41, algunos de los cuales conllevan a la inhibición de la síntesis de proteínas del hospedero, destruyendo la mayoría de los RNA mensajeros. Lo anterior permite que el HSV-2 controle la maquinaria de síntesis de proteínas y aumente la eficiencia en la producción de virus (Bascones & Pousa, 2011).

La síntesis de proteínas virales aparece en tres fases sucesivas: primero las tempranas inmediatas (alfa), luego las tempranas (beta) y finalmente las tardías (gamma). En la primera fase, la función de las proteínas es unirse al DNA para regular la transcripción del resto del genoma. En la segunda fase, las proteínas virales están involucradas en la síntesis del DNA. Entre ellas está la polimerasa viral y algunos factores de trascripción. Finalmente, en la tercera fase se sintetizan proteínas que son principalmente estructurales y que posteriormente servirán para el ensamblaje de nuevos viriones (Bascones & Pousa, 2011; R. Whitley, Kimberlin, & Prober, 2007).

iii) Combinación, encapsulación y salida: el ensamblaje se produce en el núcleo. El DNA viral se empaqueta en una cápside preformada que contiene a la proteasa viral. Para el ensamblaje se necesita la colaboración de un gran número de proteínas no capsídicas. Al empaquetar el DNA, éste sufre un proceso por el cual vuelve a ser lineal. La cápside con el DNA se une a

la membrana interna nuclear y antes de pasar al espacio perinuclear, el virión adquiere la envoltura para luego perderla en la membrana externa nuclear.

A partir de entonces, el virus pasa al retículo endoplasmático, adquiriendo de nuevo la membrana. Algunos autores apuntan a que el virión va al citoplasma atravesando la membrana plasmática, otros proponen que el virus maduro pasa al aparato de Golgi y de ahí sale como si se tratara de una proteína que se secreta, una vez ensamblado el virus, por medio de la heparanasa que es una enzima que ayuda a la salida viral, actúa encendiendo el receptor de membrana heparán sulfato la cual despeja el camino para que los virus salgan de la célula (ver figura 3). (Bascones & Pousa, 2011).



Figuras 3 Ciclo de replicación viral del HSV-2 (Jaishankar & Shukla, 2016). En la imagen se muestra el ciclo de replicación viral correspondiente al virus del herpes simplex tipo 2 (ver texto).

Una vez terminada la ronda de replicación los virus recién ensamblados pueden replicarse nuevamente en el sitio de entrada o establecer una infección latente, durante este proceso un virión intacto o la cápside se transporta de manera retrógrada a las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal. En este sitio, después de otra ronda de replicación viral, se establece la latencia (Figura 4).

Después de que se establece la latencia, en una fracción de individuos el virus se reactiva y se traslada mediante transporte anterógrado a un sitio en o cerca del sitio de entrada. Las reactivaciones ocurren después de una variedad de estímulos locales o sistémicos como el estrés, condiciones ambientales y otros factores desconocidos. Se producen infecciones recurrentes cuando el virus se reactiva de manera repetida en el individuo, de manera que el virus se vuelve evidente en los sitios mucocutáneos como vesículas de la piel o úlceras de la mucosa (Jaishankar & Shukla, 2016; R. Whitley et al., 2007) (Figura 4).

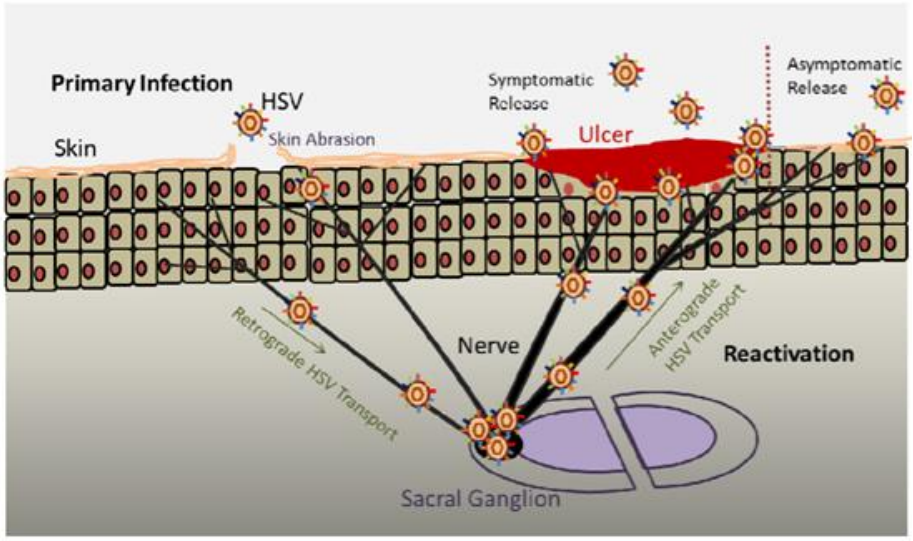


Figura 4 Infección primaria y reactivación de HSV-2, y su relación con las manifestaciones clínicas (Jaishankar & Shukla, 2016). Cuando una persona se expone al HSV-2, el virus infecta las células epiteliales. Dependiendo del sistema inmune del huésped, la infección lítica conduce a la eliminación del virus que puede causar síntomas como úlceras o permanecer asintomáticos, en la reactivación los virus del ganglio sacro viajan al sitio de la

infección primaria o a las terminaciones nerviosas altas a través de una forma anterógrada en la que la eliminación del virus puede causar síntomas o permanecer asintomáticos dependiendo del sistema inmunológico del huésped.

1.4 Transmisión.

El herpes genital causado por HSV-2 es considerado una infección de transmisión sexual. De acuerdo con la clasificación de la transmisibilidad de las enfermedades infecciosas, el HSV-2 pertenece a las infecciones virales de transmisión directa. Esta se da cuando el individuo infectado excreta partículas virales a través de sus secreciones, piel o mucosas (Brown et al., 1995; Shafii & Burstein, 2009; Tronstein et al., 2011b).

La diseminación ocurre cuando el virus se encuentra en estado replicativo (en infección primaria o reactivación) se puede encontrar en mucosas, piel y fluidos del individuo infectado, principalmente en el área genital, durante esta fase de la infección es más probable trasmitir el virus. Este proceso puede presentarse durante periodos asintomáticos o generar lesiones microscópicas. Las lesiones microscópicas actúan como una entrada/salida directa del cuerpo lo que puede desencadenar su transmisión (Tronstein et al., 2011a).

Entonces, para adquirir el HSV-2 se requiere de un contacto con mucosa, piel o con fluidos del individuo infectado en presencia o ausencia de lesiones. Cabe mencionar, que estas lesiones son consideradas factores de riesgo para la adquisición del HSV-2 y de otros patógenos como el HIV (Suazo, Tognarelli, Kalergis, & González, 2015).

Las mujeres adolescentes y jóvenes son más susceptibles a infecciones de transmisión sexual debido a la inmadurez, y en algunos casos, a lo incompletamente estrogenizado del cérvix, lo cual se caracteriza por la presencia de epitelio columnar que se extiende al ecto-cérvix. Este epitelio es más susceptible a patógenos, al

contrario del epitelio escamoso que recubre la vagina y el cérvix en mujeres adultas (Shafii & Burstein, 2009).

Aunado a lo anterior, los niveles bajos de estrógenos presentes en la adolescencia temprana tienen como consecuencia un tejido genital más delgado. Además, hay una excitación sexual insuficiente por lo que hay una mala lubricación vaginal antes de una penetración, lo que podría ocasionar en mujeres adolescentes y jóvenes un mayor riesgo de sufrir un trauma o irritación del tejido genital femenino que posteriormente podría permitir la entrada a patógenos (Shafii & Burstein, 2009).

Una mujer embarazada infectada por HSV-2 es capaz de transmitir este virus al neonato a través de la excreción viral genital, con o sin síntomas, alrededor del momento del parto; esto se conoce como transmisión vertical y causa la infección conocida como herpes neonatal (Baquero et al., 2018; Garland & Steben, 2014; Grose, 2012).

El HSV-2 puede transmitirse de forma transplacentaria (5-8% de los casos) y posnatalmente (8-10%), aunque la ruta principal es a través del paso por el canal de parto en un 85%. Cuando esto sucede, el HSV-2 se puede inocular en ojos, nasofaringe o abrasiones en la piel o la mucosa del producto. El mayor riesgo de transmisión al feto o al neonato es una infección primaria en una madre cercana al trabajo de parto o en el último trimestre. La infección antes del embarazo o antes de la gestación permite la conversión y transmisión de anticuerpos neutralizantes al lactante, sin estos anticuerpos neutralizantes el riesgo de transmisión es del 50%. Si el HSV-2 no es neutralizado en los neonatos, estos presentan principalmente daño a nivel del sistema nervioso (Baquero et al., 2018; Garland & Steben, 2014; Grose, 2012).

1.5 Manifestaciones clínicas.

El HSV-2 causa la entidad clínica llamada herpes genital. Adicionalmente, este puede infectar sitios como la boca y las superficies mucosas, de acuerdo con el sitio de infección, son diversas las enfermedades o patologías asociadas (Suazo et al., 2015) (Figura 5). Sin embargo, la infección no necesariamente causa enfermedad, actualmente se considera que hasta el 80% de los casos son asintomáticos (Unemo et al., 2013).

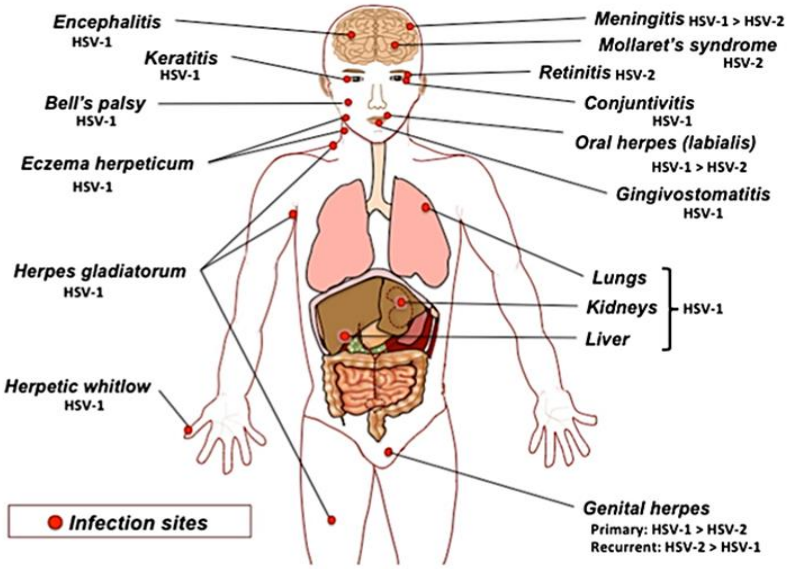


Figura 5 Sitios de infección de los Herpesvirus y las enfermedades relacionadas (Suazo et al., 2015). Se muestran las enfermedades asociadas al HSV-2 con su correspondiente sitio de infección.

Cuando el hospedero está expuesto por primera vez al virus se le denomina infección primaria. Durante esta fase, el virus infecta las células epiteliales. Usualmente las infecciones primarias son clínicamente más severas y probablemente con mayor sintomatología, dependiendo del sistema inmune del hospedero. Entre los síntomas generalizados que se pueden presentar están la fiebre, picazón, dolores musculares en la parte inferior del cuerpo, cefalea, malestar, mialgias, formación de una amplia

distribución de vesículas que evolucionan a lesiones planas que pueden aparecer en los genitales, pasado el tiempo las ampollas empiezan a sanar (Unemo et al., 2013).

Desde que se adquiere el virus hay un periodo de incubación, posteriormente se presentan los síntomas generalizados, unos días más tarde aparecen vesículas que conforme pasa el tiempo pasan a lesiones denominadas úlceras. Estas lesiones herpéticas contienen altas cantidades de viriones y leucocitos infiltrantes que combaten la infección, por lo que se considera esta etapa la de mayor probabilidad de contagio; una vez pasado alrededor de 2-21 días se da el establecimiento de costras que se resuelven sin escarificación (Suazo et al., 2015; Unemo et al., 2013) (Figura 6).

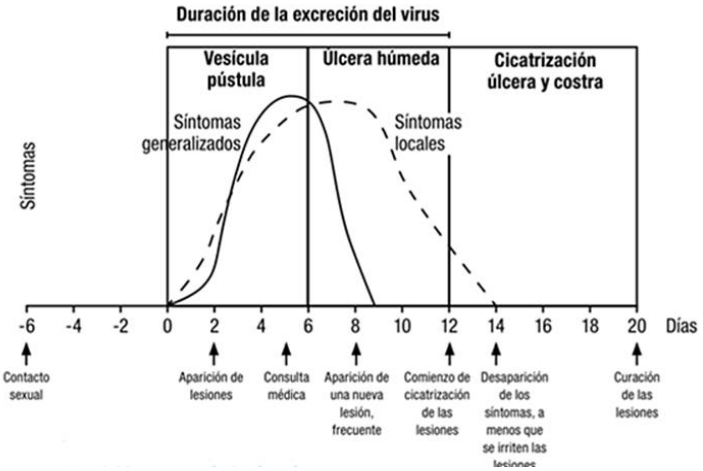


Figura 6 Duración de la excreción viral y evolución de las lesiones herpéticas (Unemo et al., 2013). En la infección por HSV-2 se presentan síntomas generalizados y síntomas locales, los cuales pueden durar aproximadamente 12-14 días al igual que la excreción del virus en zona genital, sin embargo no todas las infecciones presentan síntomas ya que la mayoría son asintomáticas.

En las mujeres, los sitios más comunes de aparición de estas lesiones son el cuello del útero, vagina, labios mayores y menores, y la región perianal. En los hombres, las lesiones se presentan principalmente en el eje o en el glande del pene; las lesiones anales se reportaron mayoritariamente en hombres que tienen sexo con hombres. El herpes genital también causa síntomas atípicos, es decir, las lesiones aparecen en

lugares como muslos y glúteos (Garland & Steben, 2014; Sauerbrei, 2016; Unemo et al., 2013).

1.6 Diagnóstico.

El diagnóstico de herpes genital basado únicamente en manifestaciones clínicas puede llegar a ser poco preciso y engañoso debido a que los signos y síntomas pueden ser confundidos con otras infecciones; por ejemplo, con *Treponema pallidum*. Además, un estado de coinfección hace más complejo el cuadro clínico y, por lo tanto dificulta el diagnóstico de herpes genital (Sauerbrei, 2016; Unemo et al., 2013; R. Whitley et al., 2007).

Existen varios métodos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por HSV-2, la diferencia en cada uno de estos métodos es la sensibilidad y especificidad de cada uno de ellos (Sauerbrei, 2016; Unemo et al., 2013).

La sensibilidad se define como la probabilidad de que un individuo enfermo tenga un resultado positivo en la prueba, detecta a los verdaderamente enfermos. La especificidad define la probabilidad de que un individuo sano tenga un resultado negativo en la prueba, excluye a los verdaderamente sanos (LeGoff, Péré, & Bélec, 2014; Unemo et al., 2013).

Los siguientes son algunos métodos diagnósticos de laboratorio para determinar la presencia de HSV-2.

- Examen citológico: La observación directa de la muestra y exámenes citológicos han observado baja sensibilidad y especificidad. Entre estos se encuentran los frotis de Tzanck o las tinciones de Papanicolaou y Romanovsky. Sin embargo, el diagnóstico de cervicitis herpética puede ser un hallazgo incidental durante el

examen de frotis de Papanicolaou que se realiza con la citología del cuello uterino, por lo que no se utiliza como prueba diagnóstica directa (Unemo et al., 2013).

- Detección de anticuerpos: ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) la más utilizada es la ELISA de tipo indirecto. Por medio de esta técnica se puede detectar la presencia de un anticuerpo específico contra un antígeno deseado. Una muestra de suero problema se añade a un pocillo de una placa recubierta con antígeno, lo que permite, si es que existe el anticuerpo en cuestión en la muestra problema, que al fondo de la placa se genere el complejo (antígeno-anticuerpo).

- Detección de los antígenos virales: En el material biológico de las lesiones mucocutáneas es posible detectar el antígeno viral mediante inmunofluorescencia directa, la tinción de la inmunoperoxidasa o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (EUROIMMUN, 2016; Unemo et al., 2013).

  La inmunofluorescencia directa se puede calificar como una prueba de diagnóstico rápido. Los antígenos del HSV-2 se detectan mediante anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluoresceína. Una de las limitaciones de esta técnica son el tiempo prolongado de realización, el costo relativamente alto debido a los reactivos y equipamiento, una baja sensibilidad. En comparación con el cultivo celular, ofrece una sensibilidad del 70% al 90% en los casos de enfermedad sintomática y mucho más baja en los casos asintomáticos. Lo anterior excluye su uso en ausencia de lesiones (Unemo et al., 2013).

  La tinción indirecta con inmunoperoxidasa utiliza un microscopio de luz normal. Las muestras se preparan de igual manera que las destinadas a la inmunofluorescencia directa y se incuban con anticuerpos monoclonales o

policlonales específicos del HSV-2. La fijación evidencia un anticuerpo marcado con peroxidasa, dirigido contra inmunoglobulinas (ratón o conejo), mediante los métodos de la inmunoperoxidasa. Tanto la inmunofluorescencia directa y la de la peroxidasa ofrecen una sensibilidad similar (Unemo et al., 2013).

Mediante la prueba clásica de ELISA indirecta se pueden detectar también proteínas herpéticas en muestras clínicas, esta emplea un anticuerpo policlonal o monoclonal específico del HSV-2. En comparación con el cultivo viral esta prueba ofrece una sensibilidad (en pruebas comerciales) similar o superior a 95% y una especificidad de 62-100% en pacientes sintomáticos; sin embargo, la sensibilidad (prueba de ELISA comercial) es inferior en los frotis de cuello uterino y de uretra (Unemo et al., 2013).

Cultivo viral: Las células que se utilizan con mayor frecuencia en el aislamiento del HSV-2 a partir de muestras clínicas son los fibroblastos diploides primarios humanos y las líneas celulares como las células MRC-5 (fibroblastos humanos), las células Vero (riñón de monos), las células Hep-2 (carcinoma escamocelular laríngeo), entre otras (Unemo et al., 2013).La presencia del HSV-2 en los cultivos celulares provoca un efecto citopático que puede observarse entre las 24 y 72 horas después de la inoculación. Este efecto se caracteriza por la transformación de las células alargadas y dispersas en agrandadas, refringentes, redondeadas, “en balón”, cuyo número aumenta y adquieren una apariencia granular. Se puede observar necrosis focal de las células y sincicios, y células gigantes multinucleadas en el borde de los conglomerados de células infectadas por el virus (Unemo et al., 2013) (Figura 7). Una vez observado el efecto citopático, se puede hacer confirmación a través del reconocimiento con anticuerpos específicos o la detección del DNA viral por métodos de amplificación molecular.

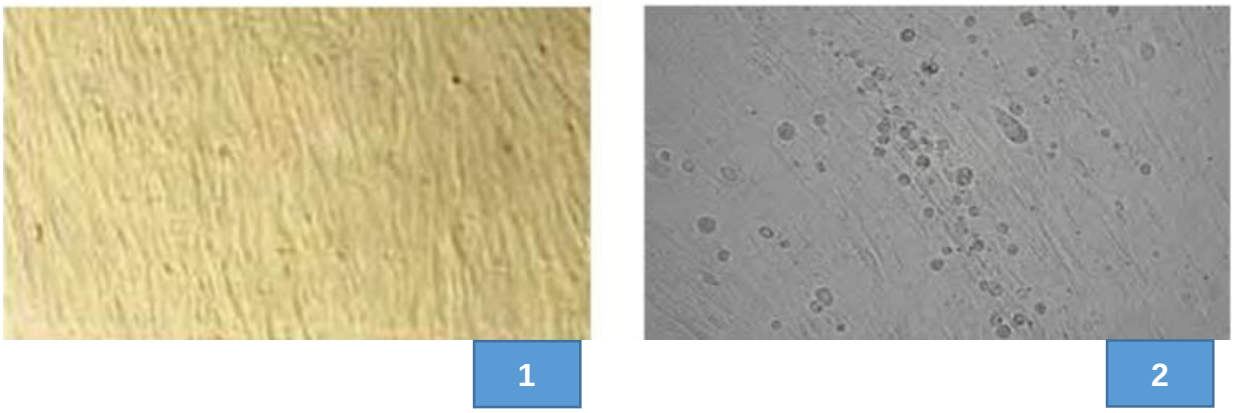


Figura 7 Efecto citopático característico del HSV-2 en células MRC-5 (Unemo et al., 2013). En la imagen 1, se observa una monocapa confluente de fibroblastos diploides humanos MRC-5 sin infección; En la imagen 2, el efecto citopático ocasionado por HSV-2.

El diagnóstico de la infección por HSV-2 en el cultivo tisular ofrece una baja sensibilidad, pues el virus se aísla de las lesiones en aproximadamente 80% de las infecciones primarias, y solo en 25-50% de las lesiones recurrentes. El aislamiento es de menor proporción en las personas cuyas lesiones están en vía de curación. La imposibilidad de detectar el HSV-2 en cultivo no significa que no exista una infección herpética. El aislamiento del virus en cultivo celular ha constituido la piedra angular del diagnóstico de la infección, pero solo es factible en los laboratorios especializados (Unemo et al., 2013).

Las ventajas del cultivo consisten en su alta especificidad y la recuperación de cepas virales que se pueden tipificar y someter a la prueba fenotípica de sensibilidad a los medicamentos antivirales. El cultivo es costoso, exige una gran intensidad de mano de obra, es lento y su sensibilidad diagnóstica es menor que la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico molecular. El retraso en la preparación y la falta de cadena de frío después de la toma de la muestra disminuyen de manera considerable el rendimiento diagnóstico (Unemo et al., 2013).

Técnicas de diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction -PCR-): El PCR permite la detección del DNA del HSV-2

en las muestras clínicas. Esta técnica hace posible la reacción de amplificación en un solo tubo y facilita las condiciones de realización (Unemo et al., 2013).

Los *primers* de las secuencias de DNA del Virus del Herpes Simplex que son comunes al HSV-1 y el HSV-2 (gen de la polimerasa del DNA [gen pol F], de la cinasa de timidina o del dominio B de la glicoproteína del Virus del Herpes) pueden detectar el DNA de ambos virus. Los *primers* y las sondas de secuencias de DNA específicas del HSV-1 o el HSV-2, como los genes gG, gD, o gI, permiten la amplificación solamente de uno de los 2 tipos del virus herpético (Unemo et al., 2013).

Las técnicas de diagnóstico molecular representan actualmente el método más sensible de detección del HSV-2 a partir de muestras genitales. Se ha demostrado que las pruebas por PCR ofrecen tasas de detección de 11-71% superiores al cultivo viral. Además, estas técnicas permiten detectar la excreción asintomática de HSV-2. Sin embargo, un resultado negativo del PCR no indica la ausencia de infección pues la excreción del virus es intermitente. La utilización de técnicas moleculares en el diagnóstico del HSV-2 permite condiciones de transporte de las muestras menos estrictas que las necesarias en el diagnóstico por cultivo (Jaishankar & Shukla, 2016; Unemo et al., 2013).

1.7 Tratamiento.

La infección por HSV-2 no tiene cura, pero sus manifestaciones son tratables. Existen tres clases de medicamentos aprobados para las infecciones por HSV-2, las cuales se dirigen a la replicación viral: análogos de guanosina, análogos de nucleótidos acíclicos y piroanálogos de fosfato; los cuales son análogos de nucleósidos y se utilizan para inhibir la DNA polimerasa viral. Entre estos se encuentran: el Valaciclovir (VLV) que es

análogo de Acyclovir, Cidofovir, Forcanet y Famciclovir (Jiang, Feng, Lin, & Guo, 2016; Tuset, López, Cervera, Moreno, & Miró, 2010).

Para infecciones primarias donde los síntomas pueden ser graves, la terapia antiviral generalmente se inicia antes de que se presenten los síntomas con ayuda del diagnóstico de laboratorio, la duración de esta terapia puede ir de 7-10 días o hasta que las lesiones sanan (R. Whitley et al., 2007).

Cuando existe dolor se puede incluir el uso de analgésicos o baños de asiento. Cabe mencionar que estos tratamientos, si bien inhiben la replicación viral y disminuyen los síntomas de la infección primaria o brotes por reactivación, el virus permanecerá de por vida en el individuo infectado (Sauerbrei, 2016).

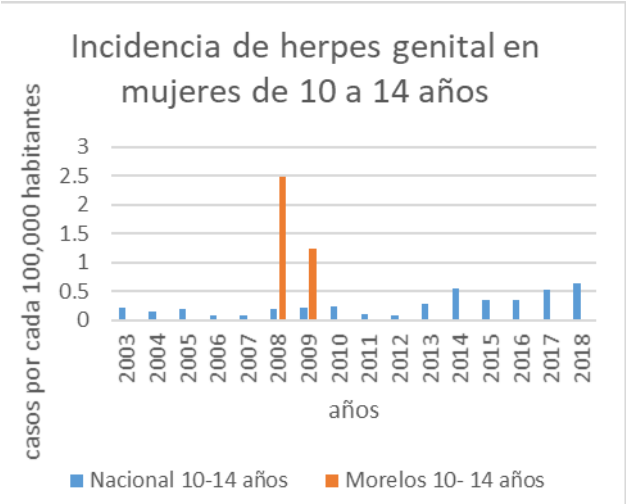
1.8 Epidemiología.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para 2012 se estimó que en el mundo había 417 millones de personas de 15- 49 años (11%) infectadas por HSV-2. Así mismo, se encontró que hay más mujeres que hombres infectados, 267 y 150 millones respectivamente (Organización Mundial de la Salud, 2017).

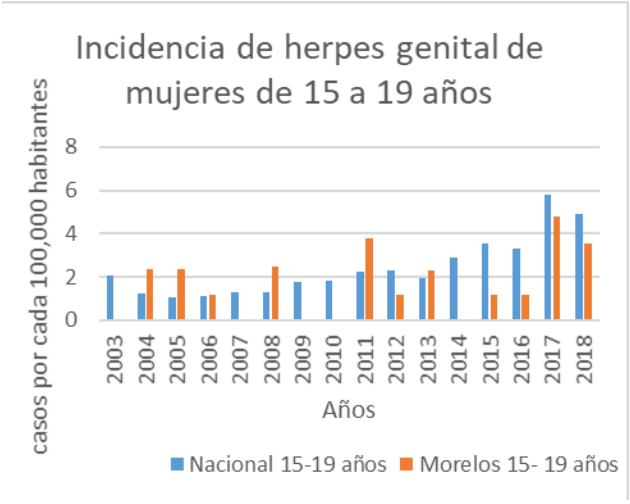
En México, la cifra de infectados por HSV-2 es de 2,915 hombres y 2,893 mujeres para la semana epidemiológica 44 del año 2019. Respecto al estado de Morelos, se reportaron 22 hombres y 27 mujeres infectados por HSV-2 para la misma semana y año, según datos de Dirección General de Epidemiología (DGE) (Secretaria de Salud, 2019). Herrera et al., 2013 reportó que la prevalencia de HSV-2 en una muestra total de 2300 mujeres embarazadas y puérperas de Morelos (México) fue de 14.5%. Para el grupo de mujeres menores de 20 años, esta prevalencia resultó del 8.6%, y en mujeres 21 a 30 años fue de 14.3% (Herrera et al., 2013).

Adicionalmente la OMS reporta que a nivel mundial de cada 100,000 recién nacidos 10 (el 0.01%) presentan herpes neonatal, la cual es una infección producida por algún tipo de Herpesvirus y que se adquiere principalmente a través del paso por el canal de parto (Organización-Mundial-de-la-Salud, 2017).

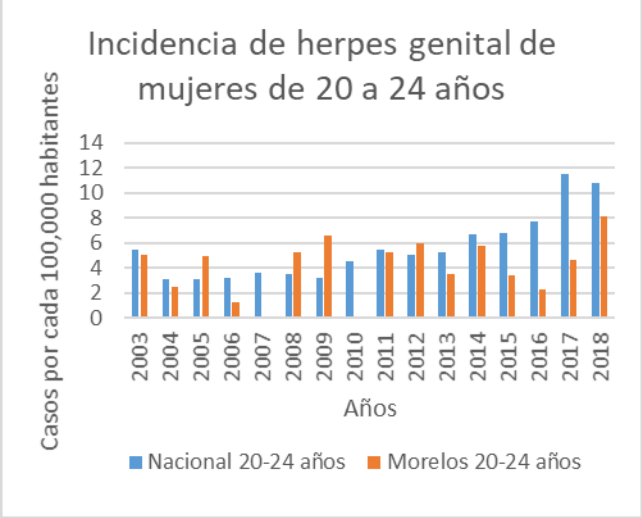
La tasa de incidencia de herpes genital en mujeres adolescentes en México ha ido en aumento, según lo reportado por la dirección general de epidemiología. En el grupo de edad de 10-14 años a nivel nacional, la incidencia aumentó 2.91 veces el número de casos por cada 100,000 habitantes entre el período 2003-2018. Así mismo, se presentó un aumento en la incidencia en el grupo de edad de 15-19 años de 2.39 veces el número de casos por cada 100,000 habitantes, para el mismo periodo antes mencionado. Para el grupo de edad de 20–24 años se presentó un aumento 1.98 veces el número de casos por cada 100,000 habitantes a nivel nacional y entre los años 2003-2018 como se puede apreciar en la figura 8 (Secretaria de Salud, 2019).



Incidencia de herpes genital en México en mujeres 10-14 años en tasa por cada 100,000 habitantes.



Incidencia de herpes genital en México en mujeres 15-19 años en tasa por cada 100, 000 habitantes.



Incidencia de herpes genital en mujeres 20-24 años en tasa por cada 10,000 habitantes.

Figura 8 Gráficas de la incidencia de herpes genital en mujeres por cada 100, 000 habitantes en México (Secretaria de Salud, 2018). del herpes genital en Morelos y en México en mujeres desde el año 2003-2018, en varios casos se observa que Morelos sobrepasa la incidencia reportada a nivel nacional.

2. JUSTIFICACIÓN

La infección con el HSV-2 afecta las mucosas genitales, principalmente en mujeres. Así mismo, las mujeres jóvenes se encuentran en mayor riesgo debido a la inmadurez de estas mucosas. Aunado a lo anterior, el HSV-2 es un virus capaz de atravesar la barrera placentaria y de infectar al recién nacido a través de su paso por el canal de parto. De acuerdo con estudios previos, en nuestro país se ha incrementado el número de embarazos en adolescentes, además pocas de ellas son tamizadas en búsqueda de patógenos como el HSV-2 y la mayoría de las infectadas son asintomáticas. Pese a lo anterior, los datos de prevalencia e incidencia de esta infección son limitados.

Por lo que es recomendable generar información sobre el estatus epidemiológico de la infección por HSV-2 en mujeres jóvenes embarazadas en el estado de Morelos; como un apoyo a la estimación de la prevalencia en dicha población y como dato de alerta para la posible transmisión vertical y presentación de casos de herpes neonatal.

3. HIPÓTESIS

Si la prevalencia de HSV-2 en Morelos se calculó del 8.6% para mujeres jóvenes embarazadas y puérperas entre el 2006 y 2009, entonces se espera encontrar una prevalencia similar o mayor en el grupo de estudio de acuerdo con el aumento en la incidencia de herpes genital.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia y diseminación de HSV-2 en mujeres embarazadas de 10-24 años que asistieron a tres centros de salud en Morelos, durante los meses de octubre de 2018 a octubre de 2019.

4..1 Objetivos específicos.

- Detectar anticuerpos contra el HSV-2 en muestras de suero de mujeres embarazadas de 10-24 años.

- Identificar la diseminación de HSV-2 en muestras de exudados genitales de las mujeres embarazadas de 10-24 años.

5. METODOLOGÍA

Se parte de una población de mujeres embarazadas de 10 a 24 años a las cuales se les solicitó firmar un consentimiento o asentamiento informado según correspondiera, adicional a esto también se les solicitó dos muestras biológicas, una de ellas es la sangre de la cual se utiliza el suero que fue procesado por la técnica de Elisa en busca de anticuerpos IgG contra HSV-2, las muestras con resultado positivo e indeterminadas se confirmaron mediante la técnica de Western blot, con los resultados se calculó la seroprevalencia. La otra muestra biológica que se solicitó fue un exudado vaginal, a partir de esas muestras se llevó a cabo la extracción de DNA, con las muestras de DNA provenientes de exudado vaginal se realizó un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento de β-globina, además de un PCR en tiempo real para la amplificación de HSV-2, los resultados se analizaron y con ello se calculó la prevalencia de diseminación. La estrategia experimental general del proyecto está representada en la figura 9.

.

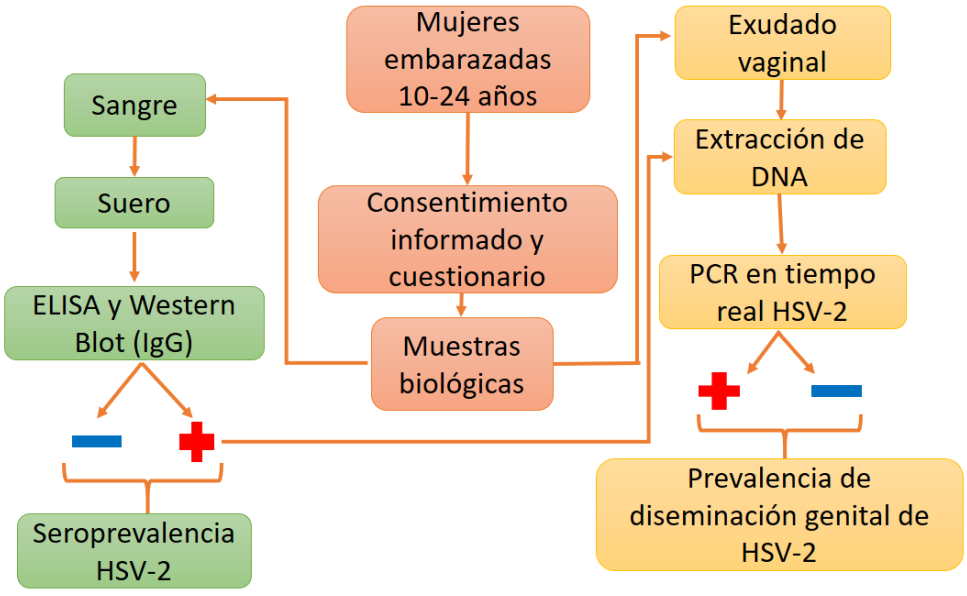


Figura 9 Estrategia experimental general desarrollada en el proyecto. La imagen muestra la estrategia experimental desarrollada en el proyecto.

5.1 Población de estudio.

La población de estudio de este trabajo forma parte del proyecto “Participación de la microbiota vaginal para el riesgo de las infecciones de trasmisión sexual durante el embarazo de mujeres de 10-24 años”. El cual se realiza en el Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del INSP, con la colaboración de los Servicios de Salud en Morelos (SSM). El objetivo del estudio primario es evaluar la diversidad de la microbiota vaginal y su asociación con la presencia de infecciones de transmisión sexual durante el embarazo (comun. pers. Herrera et al., 2018).

Se incluyeron mujeres de 10-24 años (adolescentes y jóvenes) que acuden a los Servicios de Salud de Morelos para su atención y acepten participar en el estudio. Además de requirió de un consentimiento y/o asentimiento informado según corresponda), un cuestionario sociodemográfico y de comportamiento sexual, una muestra de sangre venosa (6 ml) y una de exudado vaginal en cada una de las visitas de revisión ginecológica (una por trimestre). Las muestras colectadas se denominaron de acuerdo con el número de visita (Herrera et al., 2018). Las mujeres fueron captadas en tres Centros de Salud de Morelos (Cuernavaca, Tlaltenango y Yautepec); para el desarrollo de este protocolo se procesaron muestras colectadas desde el mes de octubre de 2018 hasta el mes de octubre de 2019 (Herrera et al., 2018).

5.2 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La detección de anticuerpos anti-HSV-2 en la población de estudio se realizó con el estuche comercial EUROIMMUN Anti-HSV-2 (gG2) ELISA (IgG) que es un ELISA indirecto de la compañía Euroimmun. El procedimiento, la validación y la evaluación de los resultados se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a la

experiencia del personal del laboratorio de Serología e Infecciones de Transmisión Sexual del Instituto Nacional de Salud Pública (Anexo 1 y 2) (EUROIMMUN, 2016).

Brevemente, el suero se diluye 1:101 y se colocan 100 µl de este en la placa antigenada, incubando durante 30 min a temperatura ambiente (18-25°C). Al cabo de este tiempo se retira el suero y la placa se lava 3 veces con el buffer de lavado 1X (en equipo lavador de placas COMBIWASH HUMAN18460), para posteriormente incubarse con el anticuerpo conjugado a peroxidasa durante 30 min. El revelado se realiza posterior a 3 lavados, e incubándose con el sustrato durante 15 min, posteriormente se agrega 100 µl buffer de parada. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de microplacas o lector de microplacas de ELISA. La validación de la placa se llevó a cabo con forme lo recomendado por el fabricante, los resultados se calcularon mediante el calculo de la razón, como numerador se coloca el valor de extinción del control o de la muestra y como denominador el valor de extinción del calibrador 2, (el valor de la extinción es valor de la O.D a 620nm – el valor de O.D a 450nm). Anexo 1, hoja de trabajo ELISA.

Una vez calculado las ratios o las razones de las muestras se catalogaron como negativos a IgG contra HSV-2 las muestras con valor <0.70, indeterminado a IgG contra HSV-2 en el intervalo ≤0.70 a <1.10 y positivos a IgG contra HSV-2 aquellas muestras con un valor ≥1.10.

5.3 Western blot antiHSV-1 / HSV-2.

La técnica Western se utilizó para identificar proteínas específicas de HSV-1 y HSV-2 en la población de estudio, con la finalidad confirmar las muestras positivas o determinar el estatus de las muestras que resultaron indeterminadas por el método de ELISA. Se utilizó el estuche comercial EUROIMMUN Anti-HSV-1 / HSV-2 gG-2

EUROLINE-WB (IgG), el cual contiene tiras con extractos de antígenos de HSV-1(gC-1 y gG-1) y con la glicoproteína G-2 de HSV-2.

El procedimiento inició con el bloqueo, se agregó 1.5 ml de buffer universal 1X a las tiras que contienen los antígenos por 15 min en agitación, se desechó el buffer y se incubó con 1.5 ml de suero diluido 1:51 durante 30 min en agitación, le lavaron las tiras con buffer universal 1X, 3 veces cada una durante 5 min en agitación, se agregó 1.5ml de conjugado enzimático (1:10) por 30 min en agitación se volvió a lavar como anteriormente se mencionó, y se agregó 1.5 ml de sustrato (NBT/BCIP) por 10 min en agitación se extrajo el líquido y para detener la reacción se enjuagó con agua destilada, los resultados se leyeron con una tira control proporcionada por el fabricante, como se presenta en la figura 10 (Anexo 3).

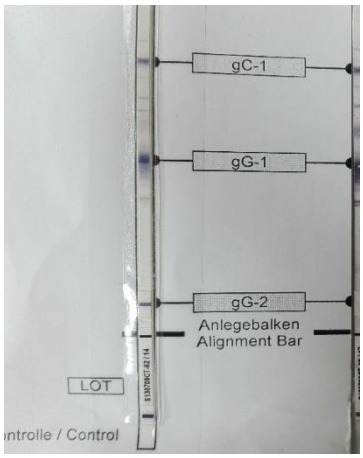


Figura 10 Tira control de Western blot. En la figura A, se puede observar la tira control proporcionada por el fabricante en donde se muestra la banda correspondiente al control de muestra, la banda correspondiente a la glicoproteína G-2 correspondiente a HSV-2 y las glicoproteínas G-1 y C-1 correspondientes a HSV-1.

5.4 Cálculo de la seroprevalencia del HSV-2.

De acuerdo con el objetivo del estudio, la seroprevalencia de HSV-2 se definió como la porción de la población positiva a IgG contra HSV-2 en el momento que se está llevando a cabo este estudio, entre el total de las participantes. Para obtener la seroprevalencia se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N° de muestras positivas}}{\text{N° de muestras totales procesadas}} \text{ X } 100 = \text{Seroprevalencia}$$

El numerador incluyó los resultados positivos obtenidos del ensayo de ELISA además de los positivos del Western blot; mientras que el denominador correspondió al total de muestras procesadas. Es importante mencionar que, para efectos de este trabajo, la prevalencia sólo incluyó a las muestras de primera vez (primera toma) de las mujeres embarazadas de 10-24 años.

5.5 Extracción y purificación de DNA.

La extracción del DNA se realizó mediante el método de adsorción en columnas de sílice con el estuche comercial ZYMO RESEARCH Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit. El método incluye tres etapas consecutivas: digestión de la célula (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares (Hoja de trabajo: Extracción de DNA, anexo 4). En resumen, a 200 µl de exudado vaginal se agregan 200 µl de buffer de biofluido además de 20 µl de Proteinasa k y se incuba durante 10 min para permitir la lisis celular, posteriormente se agregan 420 µl de buffer de unión genómica, se homogeneizó la mezcla y se coloca en una columna y un tubo colector que contiene una membrana de sílice en la que se recolecta el DNA, se centrifuga a 12,000 x g por 1 min, se deshecha el líquido y el tubo colector y se cambia por una nuevo, se agregan 400 µl de buffer de

pre-lavado se centrifuga a 12,000 x g y se retira el líquido del tubo colector, se agregan 700 µl de buffer de lavado, se centrifuga a 12,000 x g por 1min, se retira el líquido del tubo colector, se agregan nuevamente 200 µl de buffer de lavado, se centrifugo a 12, 000 x g por 1 min, se retira el líquido del tubo colector, se deshecha, se coloca la columna en un tubo de centrifuga limpio y se agregan 40 µl de buffer de elusión previamente calentado a 70°C y se incuba a temperatura ambiente durante 7 min, se centrifuga a máximo nivel y se desecha la columna, el DNA obtenido se cuantifica en el NanoDrop (ver anexo 4).

5.6 PCR punto final para la amplificación de HSV-2.

La presencia de HSV-2 en las muestras de exudado vaginal se determinó mediante la amplificación por PCR de un fragmento genómico de 151 pb (extensión de 63300 a 67071 pb) (Figura 11). Se utilizaron los *primers* F1qVHS2 y R2qVHS2 (Ver tabla 2).

Tca**tcaccgacaaggtcaaactc**t**ccagctacaagctgaacgccgtcgccgaggccgtcttgaaggacaa gaagaaggatctgagctaccgcgacatccccgcctactacgcctccgggcccgcgcagcgcggg**g**t**gat cggcgagtattgtgt**g

Figura 11 Amplicón de HSV-2 de 151 pb (resaltado en negritas) (D. N. Vergara-Ortega, 2014). Pertenece al gen UL30, *primers* resaltados en color morado.

Características de los *primers* para amplificar HSV-2		
	F1qVHS2	R2qVHS2
Secuencia (5´-3´)	tcaccgacaaggtcaaactc	acacaatactcgccgatcac
Tamaño (Pb)	20	20
Tm	54.8°C	54.9°C
GC%	50	50
Hairpin	3 (-1.2,-0.43,-0.42 Kcal. Mol $^{-1}$)	3(2-2.58 Kcal. Mol -1)
Homodímeros	7(-4.41 a -1.34 Kcal. Mol -1)	7 (-5.19 a -0.96 Kcal. Mol -1)
Heterodímeros	10 (-5.19 a -1.34 Kcal. Mol $^{-1}$)	
BLAST	SOLO HSV-2	

Tabla 2 Características de los primers F1qVHS2 y R2qVHS2 (tomado de (D. Vergara-Ortega et al., 2018)). La tabla 2 describe los resultados obtenidos del análisis de los primers con el software Oligo Analyzer 3.0.

La mezcla de reacción de PCR para la amplificación de cada muestra se llevó acabo a un volumen de 25 µl y contenía lo siguiente: se utilizó 1 µl de DNA, en un tuvo para PCR se agregó buffer de KCl a una concentración final de 1X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.32mM de dNTP´s, 0.1 u/µl de Taq polimerasa, 1µM de cada uno de los *primers* (F1qVHS2 y R2qVHS2), posteriormente se homogenizó la mezcla, y se colocó en el termociclador. Las condiciones del programa de PCR se describen a detalle en el anexo 5.

El PCR punto final se estandarizó utilizando DNA proveniente del cultivo de HSV-2 cepa G en células Vero. El amplicón se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (ver anexo 6). El producto obtenido (HSV-2 151pb), se purificó a partir de su banda en el gel de agarosa con el estuche comercial DNA extraction kit Pure Extreme #K0513 de Fermentas. Este producto fue utilizado como control positivo para los experimentos de PCR en tiempo real para amplificar HSV-2.

5.7 PCR en tiempo real para la amplificación de HSV-2 (151pb).

El protocolo para la amplificación de este fragmento se llevó a cabo conforme a lo reportado por Vergara Ortega (2014; 2018) la mezcla de reacción para una muestra de este PCR en tiempo real se llevó a cabo a un volumen total de 12 µl, que contenía 1X de Maxima SYBR Green, 0.3µM de cada uno de los *primers*, y 1 µl de DNA, posteriormente la mezcla se homogeneizó y se colocó en el termociclador previamente programado con las condiciones propias del experimento (ver anexo 8). Las muestras que amplificaron el producto esperado antes del ciclo 35 fueron consideradas positivas a HSV-2 y se denominaron como muestras con diseminación viral.

5.8 Cálculo de la prevalencia de diseminación de HSV-2.

La prevalencia de diseminación fue calculada con la fórmula utilizada anteriormente para la seroprevalencia, en cuyo caso el numerador representa las muestras positivas a diseminación viral; y como denominador al total de muestras procesadas por PCR. (seropositivas a VHS-2).

6. RESULTADOS

6.1 Descripción de la población.

Se incluyeron en el estudio 480 mujeres embarazadas que asistieron a los centros de salud Yautepec, Cuernavaca y Tlaltenango. El periodo comprendió de octubre de 2018 a octubre de 2019 (Tabla 4). La mayoría de las mujeres tenían entre 20-24 años (259, 53.96%), mientras que solo el 2.5 % (12) estaban en el intervalo de edad de 10 a 14 años, el resto (209, 43.5%) tuvieron entre 15 y 19 años. La mayoría pertenecen al centro de salud ubicado en Yautepec (62.29%), mientras que del centro de salud de Tlaltenango solo se captaron siete mujeres (1.46 %). Por trimestre de embarazo, se

observó que la mayoría fueron incluidas en el estudio cuando cursaban su segundo trimestre de embarazo (39.58%), dos de las mujeres incluidas desconocían su trimestre de embarazo al momento de su inclusión en el estudio, Tabla 3.

Variables	Categorías	N	Porcentaje %
Edad (años)	10-14	12	**2.5**
	15-19	209	43.54
	20-24	259	**53.96**
Centro de salud	Tlaltenango	7	1.46
	Leyva	174	36.25
	Yautepec	299	**62.29**
Trimestre de embarazo	Se desconoce	2	0.42
	Primero	125	26.04
	Segundo	190	**39.58**
	Tercero	163	33.96

Tabla 3 Descripción de la población de primera visita. En la tabla se observan las variables edad, centro de salud y trimestre de embarazo y el porcentaje correspondiente a cada una.

6.2 Detección de anticuerpos anti HSV-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas.

En total se procesaron 617 muestras de suero pertenecientes a 480 mujeres embarazadas (480 muestras de primera visita,123 muestras de segunda visita y 14 muestras de tercera visita). De las 480 muestras de suero procesadas de primera visita, se detectaron 34 mujeres positivas a anticuerpos contra HSV-2 (tabla 4), 429 negativas y 17 mujeres con resultado indeterminado. Estas últimas se procesaron nuevamente por medio de Western blot para determinar su estatus serológico. Las muestras positivas fueron procesadas en una ocasión por el mismo ELISA.

Código de participante	ELISA 1	ELISA 2	ESTATUS
M534-1	3.773	4.031	Positivo
M157-1	3.308	2.913	Positivo
M434-1	2.817	3.355	Positivo
M477-1	2.755	2.636	Positivo
M317-1	2.580	2.497	Positivo
M144-1	2.508	2.828	Positivo
M174-1	2.492	3.087	Positivo
M375-1	2.420	2.959	Positivo
M399-1	2.358	2.872	Positivo
M064-1	2.151	2.151	Positivo
M145-1	2.106	1.403	Positivo
M158-1	1.948	2.380	Positivo
M447-1	1.860	2.073	Positivo
M193-1	1.822	2.803	Positivo
M067-1	1.773	2.682	Positivo
M143-1	1.766	2.751	Positivo
M457-1	1.747	2.043	Positivo
M392-1	1.746	2.197	Positivo
M308-1	1.671	1.638	Positivo
M087-1	1.670	1.975	Positivo
M151-1	1.649	1.373	Positivo
M147-1	1.647	2.435	Positivo
M013-1	1.615	1.931	Positivo
M264-1	1.575	1.442	Positivo
M401-1	1.575	1.927	Positivo
M479-1	1.561	1.433	Positivo
M426-1	1.451	1.847	Positivo
M391-1	1.438	1.748	Positivo
M412-1	1.425	1.943	Positivo
M237-1	1.383	1.872	Positivo
M084-1	1.328	1.439	Positivo
M074-1	1.288	1.16	Positivo
M302-1	1.248	1.345	Positivo
M452-1	1.117	1.611	Positivo

Tabla 4 Resultados positivos de las muestras de primera visita procesadas por el estuche comercial EUROIMMUN Anti-HSV-2 (gG2) ELISA (IgG). El valor de la razón de ELISA de las muestras procesadas en dos ocasiones para confirmar su estatus (ELISA 1 y ELISA 2), si eran concordantes se consideraron positivas de acuerdo al punto de corte establecido (>1.10).

6.3 Distribución de frecuencias de la razón de absorbancia (ELISA).

El estuche comercial EUROIMMUN Anti-HSV-2 (gG2) ELISA (IgG), recomienda que el intervalo de las muestras consideradas indeterminadas sea de ≥0.80 a <1.10. Al analizar la distribución de la razón de absorbancia de las muestras procesadas, nos percatamos que el punto de corte de las muestras indeterminadas puede ser ampliado a ≥0.70 - <1.10 debido a que la distribución de la razón en el intervalo 0.81-1 es muy similar a la del intervalo 0.61-0.8 (figura 12). Por lo que ampliar el intervalo permite detectar un mayor número de muestras probablemente positivas a HSV-2, lo cual fue confirmado mediante Western blot, como se describe a continuación.

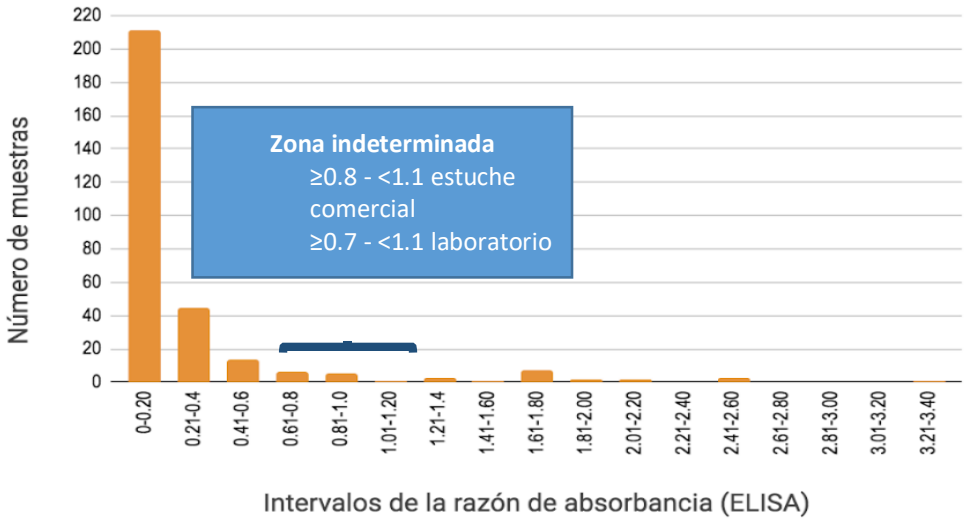


Figura 12 grafica de la razón de absorbancia (ELISA). En la gráfica se muestran los intervalos de la razón de absorbancia en la técnica de ELISA, en los intervalos 0.0-0.4 se muestran las absorbancias catalogadas como negativas, los intervalos de 0.41-1.10 las absorbancias consideradas indeterminadas, y las de 1.11 en adelante las absorbancias consideradas como positivas.

6.4 Confirmación de las muestras indeterminadas mediante Western blot.

Las 17 muestras indeterminadas mediante la prueba de ELISA, se procesaron por un Western blot con el estuche comercial EUROIMMUN Anti-HSV-1 / HSV-2 gG-2 EUROLINE-WB (IgG), el cual tiene una mayor sensibilidad y puede detectar la presencia de anticuerpos anti-HSV-2 que no son detectados por ELISA. De esta manera, nueve muestras resultaron positivas para HSV-2, mientras que ocho fueron negativas (ver figura 13 y tabla 5).

Código del participante	R. ELISA 1	R. ELISA 2	Estatus de ELISA	Resultado DE W.B
M478-1	1.198	1.000	Indeterminado	Positivo
M466-1	0.996	0.908	Indeterminado	Positivo
M185-1	0.923	0.843	Indeterminado	Positivo
M440-1	0.734	0.778	Indeterminado	Positivo
M102-1	0.904	0.902	Indeterminado	Positivo
M080-1	0.877	0.818	Indeterminado	Positivo
M207-1	0.730	0.800	Indeterminado	Positivo
M217-1	0.709	1.028	Indeterminado	Positivo
M422-1	0.743	0.897	Indeterminado	Positivo
M048-1	0.899	0.848	Indeterminado	Negativo
M326-1	0.882	0.767	Indeterminado	Negativo
M301-1	0.775	0.542	Indeterminado	Negativo
M135-1	0.768	0.778	Indeterminado	Negativo
M112-1	0.654	0.724	Indeterminado	Negativo
M131-1	1.190	0.766	Indeterminado	Negativo
M265-1	0.781	0.716	Indeterminado	Negativo
M548-1	0.754	---	Indeterminado	Negativo

Tabla 5 Confirmación de estatus de las muestras indeterminadas. En la tabla se muestra la columna 1 el código de la participante, en la columna 2 y 3 las absorbancias que resultaron tras los procesamientos por la técnica de ELISA (dos repeticiones), en la columna 4 el estatus determinado por la técnica de ELISA y en la columna 5 resultado del procesamiento de la técnica de Western blot.

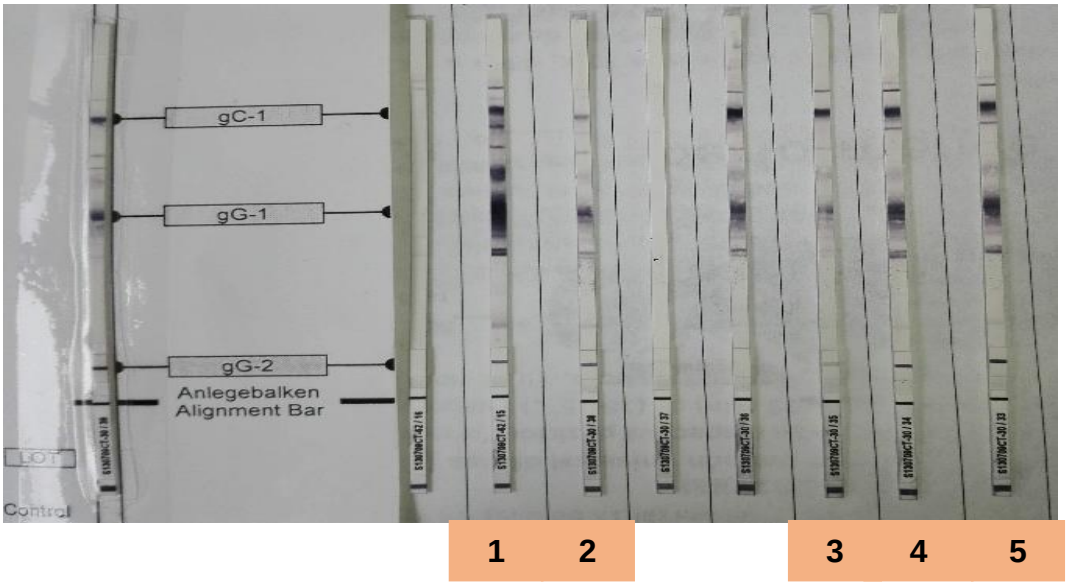


Figura 13 Tiras de Western blot procesadas con suero de mujeres embarazadas. En la figura se observa la tira control proporcionada por el fabricante y 8 tiras procesadas con suero de mujeres embarazadas, en 5 tiras se observa la presencia de anticuerpos IgG-2 (señalados con un recuadro anaranjado) que corresponden a un resultado positivo a HSV-2.

6.5 Seroprevalencia de HSV-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas.

La seroprevalencia de HSV-2 en mujeres jóvenes embarazadas se calculó a partir de las muestras de primera visita procesadas por ambos ensayos serológicos, 34 mujeres positivas por la técnica de ELISA y 9 mujeres positivas por Western blot; por lo que la seroprevalencia se calculó de 8.95% (IC95% 6.70-11.87).

$$\frac{43 \text{ Positivas}}{480 \text{ Procesadas}} \times 100 = 8.95\%$$

Al analizar los resultados serológicos de HSV-2 y las variables edad, centro de salud de procedencia y trimestre de embarazo, resultó que la mayoría de las mujeres con seropositivas pertenecen al grupo de edad de 20-24 años, son provenientes del centro de salud de Yautepec, y cursaban el primer trimestre de embarazo (tabla 6).

Variables	Categorías	N positivas a diseminación	N población Total	Porcentaje %
Edad (años)	10-14	2	12	16.6
	15-19	9	209	4.3
	20-24	**32**	**259**	**12.3**
Centro de salud	Tlaltenango	0	7	0
	Leyva	14	174	8
	Yautepec	**29**	**299**	**9.6**
Trimestre de embarazo	**Primero**	**13**	**125**	**10.4**
	Segundo	14	190	7.3
	Tercero	**16**	**163**	**9.8**
	Se desconoce	0	2	0

Tabla 6 Características de las muestras positivas a HSV-2 por serología. En la tabla se muestran las variables edad, centro de salud de procedencia y trimestre de embarazo, y al final de la tabla se muestra el porcentaje de positivas a HSV-2 en el total de la población (480 mujeres embarazadas).

Adicionalmente, se procesaron 123 muestras de suero de segunda visita de las cuales 8 de ellas se volvieron a confirmar positivas para HSV-2 (de acuerdo con el resultado obtenido en la muestra de primera visita), y 115 de ellas fueron negativas. Cabe mencionar que no se encontraron resultados indeterminados. Solo 14 de las muestras procesadas son pertenecientes a tercera visita y estas continuaron con resultados negativos para HSV-2.

6.6 Estandarización de PCR tiempo real de HSV-2.

Para la estandarización del PCR tiempo real, primeramente, se corroboró la funcionalidad de los *primers* por PCR punto final. Para lo cual se utilizó DNA obtenido en la extracción de los cultivos celulares de HSV-2, de acuerdo con las condiciones descritas previamente en metodología. Los resultados se muestran en la figura 14, donde se puede observar el producto amplificado de 151 pb. Presumiblemente, la banda de abajo observada en los tres carriles corresponde a dímeros de *primers.* El producto de 151 pb se purificó para ser utilizado como control positivo (DNA HSV-2) en los posteriores ensayos de PCR en tiempo real.

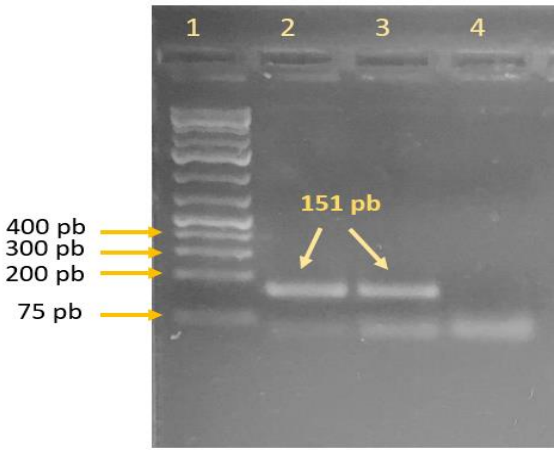


Figura 14 Gel de agarosa al 2% con productos de HSV-2 DE 151 pb. El PCR punto final se realizó de acuerdo a lo mencionado en metodología y se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Los productos fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio. 1: Marcador de PM 1 kb; 2 y 3 DNA de HSV-2 extraído del cultivo celular en células VERO 4. Control negativo (agua).

6.7 Determinación del límite de detección para PCR en tiempo real de HSV-2.

Una vez confirmado el resultado de PCR punto final, se procedió a estandarizar el PCR tiempo real, bajo las condiciones descritas previamente. Se generaron diluciones seriadas con un factor de dilución base 2 de DNA blanco a una concentración de 4.4

ng/µl, partiendo de una dilución 1:2 con 6 órdenes de magnitud. Cada una de las diluciones fue procesada por duplicado, la finalidad de dicho ensayo fue la de determinar el límite de detección (Ct 26.6, [0.13ng/µl]. En la figura 15 se muestra la curva estándar generada.

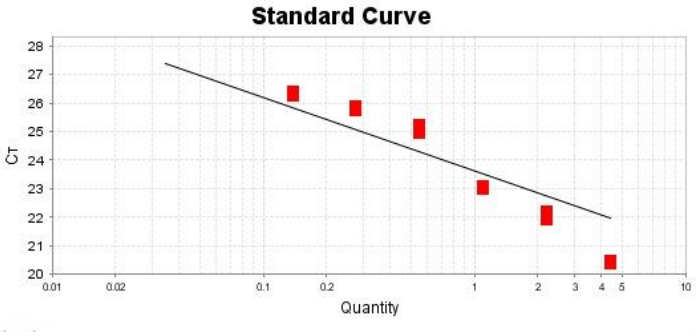


Figura 15 Curva estándar para HSV-2. En la gráfica se muestran los valores del Ciclo umbral (C_t) (recuadros rojos) para cada una de las diluciones y sus réplicas.

6.7 Determinación de diseminación de VHS-2 en mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas.

Para determinar diseminación genital del HSV-2, las muestras vaginales de las participantes positivas por serología a HSV-2 se procesaron por PCR en tiempo real, cada muestra fue procesada por duplicado en reacciones de 12 µl, como se describe en metodología. Cabe mencionar que para el cálculo de la prevalencia de diseminación, se tomaron en cuenta 41 muestras de mujeres positivas a HSV-2 y dos se descartaron debido a la ausencia de muestra vaginal. En la figura 16 “A” se puede observar la curva de amplificación de las muestras procesadas donde el Ct de las que las muestras positivas fue de 23-27 y en la figura 16 B se muestran las curvas de disociación de una placa representativa, donde es importante resaltar la presencia de dos picos, los picos cercanos a 74°C son la presencia de dímeros en la reacción (principalmente se presentan en muestras con poco contenido de DNA de HSV-2), y el pico en el intervalo de 84.75-85,75°C corresponden a la temperatura de disociación

del producto amplificado de 151pb de HSV-2. El resultado de la amplificación fue 15 muestras positivas a HSV-2, 26 negativas.

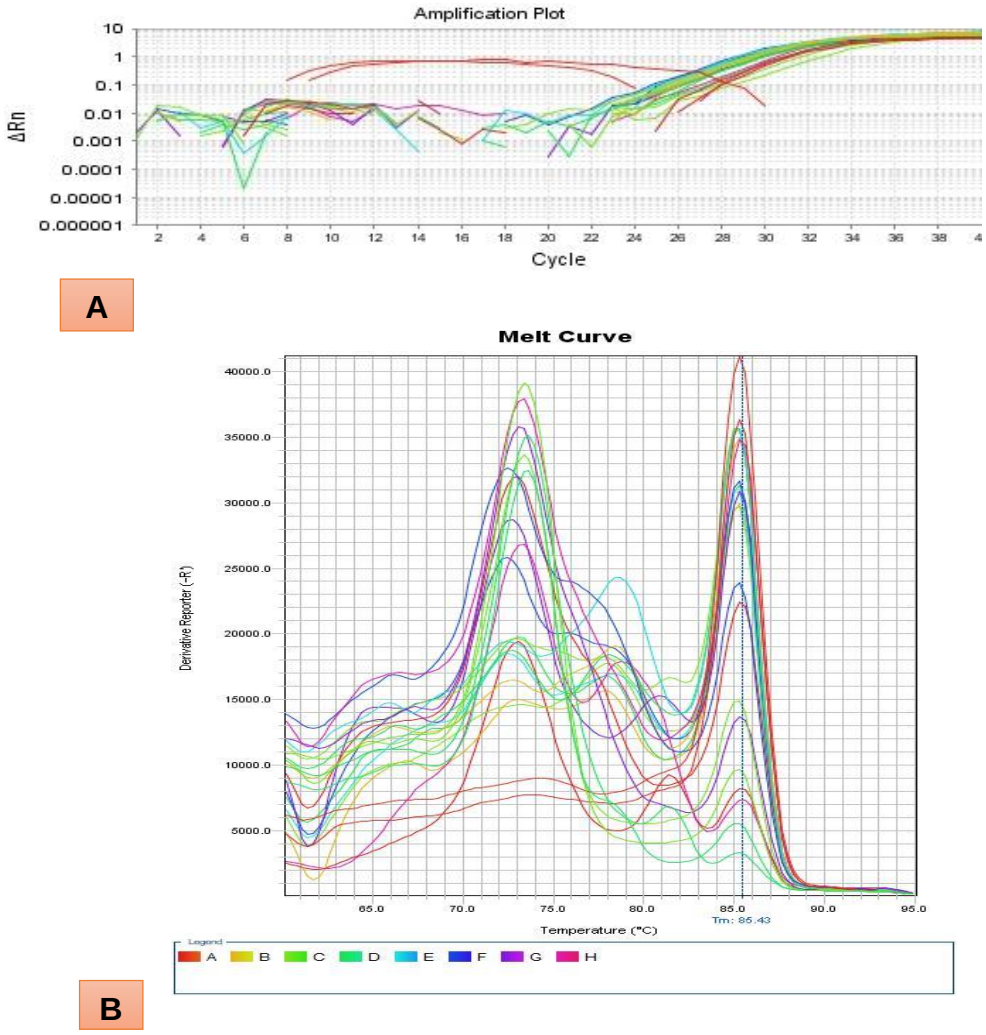


Figura 16 Amplificación de HSV-2 por PCR en tiempo real de muestras provenientes de mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas. A) La figura muestra la curva de amplificación de muestras provenientes de mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas positivas a HSV-2 por serología.
B) La figura muestra la curva de disociación de las muestras provenientes de mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas positivas a HSV-2 por serología.

6.8 Prevalencia de diseminación genital entre las mujeres positivas a HSV-2 por serología.

Por lo que la prevalencia de diseminación entre las positivas a HSV-2 por serología fue de 36.59 % (IC95%23.55-51.92).

$$\frac{\text{N° de muestras positivas}}{\text{N° de muestras totales procesadas}} \times 100 = \text{Prevalencia de diseminación}$$

$$\frac{15}{41} \times 100 = 36.59\ \%$$

6.9 Prevalencia de diseminación genital en el total de la población.

La prevalencia de diseminación en el total de la población se calculó considerando las 480 mujeres incluidas de primera visita en, y las muestras positivas a diseminación genital de HSV-2 por PCR en tiempo real (15). Por lo cual se obtuvo un porcentaje de 3.12% (IC95% 1.86-5.13).

$$\frac{15}{480} \times 100 = 3.12\%$$

Al analizar los resultados de diseminación de HSV-2 y las variables edad, centro de salud de procedencia y trimestre de embarazo, resultó que la mayoría de las mujeres con diseminación genital pertenecen al grupo de edad de 20-24 años, son provenientes del centro de salud de Yautepec, y cursaban el tercer trimestre de embarazo (tabla 7).

Variables	Categorías	N positivas a diseminación	N población Total	Porcentaje %
Edad (años)	10-14	0	12	0
	15-19	2	209	0.95
	20-24	13	259	5
Centro de salud	Tlaltenango	0	7	0
	Leyva	4	174	2.29
	Yautepec	11	299	3.67
Trimestre de embarazo	Primero	3	125	2.4
	Segundo	5	190	2.63
	Tercero	7	163	4.29

Tabla 7 Características de las muestras positivas a diseminación genital por HSV-2. En la tabla se muestran las variables edad, centro de salud de procedencia y trimestre de embarazo, y al final de la tabla se muestra el porcentaje de positivas a HSV-2 en el total de la población (480 mujeres embarazadas).

7. DISCUSIÓN.

Seroprevalencia de HSV-2.

En el presente trabajo se obtuvo la seroprevalencia de HSV-2 en mujeres embarazadas de 14 a 24 años del estado de Morelos en el periodo octubre 2018 a octubre de 2019. Por el método de ELISA se obtuvieron 34 muestras positivas, 429 negativas y 17 muestras indeterminadas. Estas últimas fueron procesadas por Western blot, un método con mayor sensibilidad que permitió detectar 9 muestras resultaron positivas a HSV-2. Es importante mencionar que 4 de las 9 muestras confirmadas por Western blot tenían un índice de anticuerpos de 0.7, que de acuerdo al punto de corte marcado en las instrucciones del estuche comercial (0.8), habrían sido clasificadas como negativas, pero al ampliar este punto de corte de acuerdo a la experiencia del laboratorio fue posible incluirlas para su procesamiento por Western

blot y ser clasificadas como positivas. La técnica de Western blot es una prueba más sensible que la técnica ELISA (Vargas-Duarte, López-Páez, Escovar-Castro, & Fernández-Manrique, 2009) por lo que, con esta técnica permitió clasificar a las 17 muestras que por ELISA estaban en la zona gris o indeterminada, siendo 9 positivas para HSV-2 y 8 negativas.Con los resultados de ambas pruebas serológicas se calculó una seroprevalencia de HSV-2 en la población de estudio de 8.95% (43 de 480).

Al analizar por intervalos de edad, se encontró una seroprevalencia en adolescentes embarazadas (14-19 años) de 4.97%, el cual es menor a lo reportado previamente por Herrera y colaboradores, quienes realizaron un estudio con mujeres embarazadas y puérperas entre los años 2006 – 2009 en 4 hospitales del estado de Morelos, encontrando que una prevalencia de 8.6% entre las mujeres menores de 20 años. La seroprevalencia en nuestro estudio de las mujeres jóvenes (20-24 años) fue de 12.4% comparable a lo encontrado en el estudio previo en mujeres de 21-30 años de 14.3% (Herrera et al., 2013).

A nivel nacional, los datos de seroprevalencia que existen en México provienen de las encuestas nacionales de salud y nutrición (ENSANUT). En el año 2006, se estimó una prevalencia de HSV-2 del 9.9 % para población general (hombres y mujeres de 20 o más años), mientras que en la ENSANUT 2012 se estimó la prevalencia en 12.2% también para población general (15 a 49 años). La prevalencia estimada en este trabajo se encontró por debajo de la mencionada; sin embargo, se debe considerar que el resultado de las ENSANUTs incluye a hombres y mujeres y grupos de edades de 49-60 años, por lo que la mayor prevalencia se debe al acumulado de positivos, debido a que los anticuerpos contra HSV-2 permanecen el resto de la vida de la persona infectada (Conde-Glez et al., 2013) (ENSANUT, 2006).

De manera relevante, en este estudio en adolescentes embarazadas encontramos una seroprevalencia de HSV-2 del 3.8%, que resulta ser más alta a la prevalencia reportada en ENSANUT 2012, para mujeres de 15-19 años (embarazadas y no embarazadas)

de 2.8%, (Sanchez-Aleman et al., 2018). Sugiriendo que las mujeres embarazadas tienen un mayor riesgo de infección a HSV-2.

La seroprevalencia de HSV-2 encontrada en nuestro estudio (8.95%) fue menor a lo encontrado en Estados Unidos de América la cual fue de 21.1% entre los años de 1999-2014 en mujeres embarazadas y mujeres no embarazadas sexualmente activas de 10-19 años. Podemos atribuir estas diferencias a la diversidad de razas/etnias que existe en ese país (Blanco no hispano, Negro no hispano, Mexicano americano, son las etnias y razas evaluadas en este estudio), a la inclusión de mujeres no embarazadas y al periodo de tiempo evaluado (Patton, Bernstein, Liu, Zaidi, & Markowitz, 2018). Así mismo, en 2018 fue publicado un artículo realizado en Río de Janeiro, Brasil donde se calculó una seroprevalencia en mujeres embarazadas coinfectadas con VIH, del 59.7% (por IgG) y una seroprevalencia de 6% (por IgM). La seroprevalencia que calculamos para el estado de Morelos (8.95%) es baja comparada con la encontrada en el artículo mencionado; en este sentido cabe resaltar que las personas coinfectadas con VIH son más vulnerables a infecciones entre las cuales destaca el HSV-2 (Lima et al., 2018).
Otro dato relevante es la seroprevalencia de 31.4% de HSV-2 encontrada en Haití, la cual tuvo por muestra a mujeres embarazadas que participaron en una actividad nacional de vigilancia del VIH. Esta seroprevalencia, al igual que en el estudio de Río de Janeiro incluyó a mujeres embarazadas coinfectadas con VIH, la cual es considerada una población de mayor riesgo para la adquisición de otras ITS (Domercant et al., 2017).

Finalmente, podemos resaltar que la OMS reporta que el mayor número de infecciones por HSV-2 se da en adolescentes y múltiples artículos señalan que las mujeres son más propensas de contraerlas, las cuales son características de la población analizada en este estudio (Organización Mundial de la Salud, 2017; Shafii & Burstein, 2009).

Diseminación vaginal de HSV-2.

La diseminación viral es la excreción o presencia de virus en el área genital (Jaishankar & Shukla, 2016), parte del interés del proyecto se centró en detectar a las mujeres con diseminación genital de HSV-2; lo cual puede ser benéfico para la mujer y su recién nacido (Baquero et al., 2018; Garland & Steben, 2014; Grose, 2012), se evaluó la presencia de HSV-2 en el área genital por medio de PCR en tiempo real.

La prevalencia de diseminación genital de HSV-2 encontrada en este proyecto fue de 36.59% entre mujeres con anticuerpos contra HSV-2, es decir 1 de cada 3 mujeres estaban excretando el virus en el área genital al momento de la toma de muestra. Este es el primer estudio en México que evalúa la diseminación de HSV-2 en mujeres embarazadas 10-24 años. Cabe resaltar que de las 15 mujeres con diseminación, 12 se encontraban en el 3er trimestre de embarazo y este dato es muy importante, debido a que cuando la diseminación ocurre en este periodo o al momento del parto, existe un mayor riesgo de transmisión vertical, dando lugar al desarrollo de herpes neonatal (Baquero et al., 2018).

En este estudio se encontró una prevalencia de diseminación genital en el total de la población de 3.12%, que es similar al 3.7% de diseminación reportada en Río de Janeiro entre mujeres embarazadas infectadas con VIH positivas a HSV-2 por serología con anticuerpos IgG (Lima et al., 2018). Lo que propone a considerar a las mujeres embarazadas como una población en riesgo.

8. LIMITACIONES.

En el presente estudio la seroprevalencia se calculó utilizando dos pruebas de detección de IgG contra HSV-2, ELISA y Western blot. Al detectar IgG se tiene la limitante de no detectar infecciones recientes (que aún no han desarrollado una respuesta inmune con IgG) por lo que el cálculo de seroprevalencia podría estar subestimado, ya que artículos mencionan que la serología tiene poca sensibilidad para identificar infecciones recientes (Baquero et al., 2018). Para subsanar esta situación, podría investigarse presencia de IgM cuyos anticuerpos se forman durante una infección reciente o primo-infección.

No se consideró como control de extracción y amplificación, la detección de β-globina mediante PCR, debido a que no se contó con todos los resultados. Lo que podría estar subestimando la diseminación del VHS-2.

De la misma manera, el cálculo de prevalencia de diseminación podría estar subestimado, debido a que para la detección de PCR en tiempo real solo se consideró a las muestras previamente determinadas como seropositivas a HSV-2, por lo que las infecciones recientes o primo-infecciones no detectadas por serología no fueron incluidas para investigar diseminación genital de HSV-2. La posible solución sería procesar todas las muestras de exudado vaginal independientemente de su resultado de serología, puesto que la sensibilidad del PCR en tiempo real es mucho más alta que la de ELISA y Western blot.

9. CONCLUSIONES

- La seroprevalencia de HSV-2 en mujeres embarazadas de 14 a 24 años del estado de Morelos fue del 8.95%, la cual es menor a las seroprevalencias reportadas en otros estudios para poblaciones similares.

- La prevalencia de diseminación de HSV-2 del 36.58% en el área genital, a pesar de que las participantes no tenían lesiones aparentes.

- La prevalencia de diseminación fue mayor en el grupo de embarazadas de 20-24 años, en las mujeres provenientes del centro de salud de Yautepec y en aquellas que cursaban el tercer trimestre de embarazo, lo que resalta el riesgo de transmisión vertical al momento del parto.

- Los hallazgos de este estudio resaltan la importancia de que las mujeres adolescentes y jóvenes embarazadas tengan una mayor vigilancia en el control de infecciones por este virus (HSV-2), no sólo a nivel clínico; ya que al conjuntar los datos encontrados y con base en que aproximadamente un 80% de las infecciones por HSV-2 son asintomáticas (Herrera et al., 2013), se hace evidente la importancia de evaluar diseminación genital de HSV-2 por métodos moleculares como el PCR en tiempo real (Tronstein et al., 2011a) para prevenir los casos de herpes neonatal (Baquero et al., 2018).

10. RECOMENDACIONES

Evaluación de infección primarias de HSV-2 por serología para la detección de IgM y PCR en tiempo real a todas las muestras de exudado vaginal independiente de su condición serológica.

A los servicios de salud se les recomienda investigar diseminación a las mujeres seropositivas a HSV-2 sobre todo durante el último trimestre del embarazo y previo al parto para disminuir o prevenir la transmisión vertical.

11. REFERENCIAS.

Baquero, F., Prieto, L., José, R. A., Alarcón, A., de la Calle, M., Frick, M., … Noguera, A. (2018). Guía de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección neonatal por virus herpes simplex. *Anales de Pediatría*, *89*(1), 64.e1-64.e10. https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2018.01.004

Bascones, A., & Pousa, X. (2011). Herpesvirus. *Avances En Odontoestomatología*, *27*(1), 11–24. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0213-12852011000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Brown, Z. A., Benedetti, J. K., Watts, D. H., Selke, S., Berry, S., Ashley, R. L., & Corey, L. (1995). A comparison between detailed and simple histories in the diagnosis of genital herpes complicating pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *172*(4 Pt 1), 1299–1303. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7726273

Burrel, S., Boutolleau, D., Ryu, D., Agut, H., Merkel, K., Leendertz, F. H., & Calvignac-Spencer, S. (2017). Ancient Recombination Events between Human Herpes Simplex Viruses. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(7), 1713–1721. https://doi.org/10.1093/molbev/msx113

Conde-Glez, C., Lazcano-Ponce, E., Rojas, R., DeAntonio, R., Romano-Mazzotti, L., Cervantes, Y., & Ortega-Barria, E. (2013). Seroprevalences of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cytomegalovirus in a cross-sectional study in Mexico. *Vaccine*, *31*(44), 5067–5074. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.077

Domercant, J. W., Jean Louis, F., Hulland, E., Griswold, M., Andre-Alboth, J., Ye, T., & Marston, B. J. (2017). Seroprevalence of Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) among pregnant women who participated in a national HIV surveillance activity in Haiti. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 577. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2674-4

EUROIMMUN, P. company. (2016). *Anti-HSV-2 (gG2) ELISA (IgG) Diagnostic application Technical data Type-specific quantitative determination of IgG antibodies against HSV-2 Based on purified glycoprotein G2 (gG2) Fully automated processing and evaluation*. Retrieved from www.euroimmun.com

Garland, S. M., & Steben, M. (2014). Genital herpes. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *28*(7), 1098–1110. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.07.015

Gayet, C. (2015). *Infecciones de transmisión sexual en México: una mirada desde la historia y el género* (Primera Edición). México D. F. Retrieved from http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/ITS_en_Mex_una_mirada.pdf

Grose, C. (2012). Acute Retinal Necrosis Caused by Herpes Simplex Virus Type 2 in Children: Reactivation of an Undiagnosed Latent Neonatal Herpes Infection. *Seminars in Pediatric Neurology*, *19*(3), 115–118.

https://doi.org/10.1016/j.spen.2012.02.005

Herrera, A., Conde, C. J., Vergara, D. N., García, S., Olamendi, M. L., & Sánchez, M. A. (2013). Avidity of antibodies against HSV-2 and risk to neonatal transmission among Mexican pregnant women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, *2013*, 140142. https://doi.org/10.1155/2013/140142

Jaishankar, D., & Shukla, D. (2016). Genital Herpes: Insights into Sexually Transmitted Infectious Disease. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, *3*(9), 438–450. https://doi.org/10.15698/mic2016.09.528

Jiang, Y.-C., Feng, H., Lin, Y.-C., & Guo, X.-R. (2016). New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *International Journal of Oral Science*, *8*(1), 1–6. https://doi.org/10.1038/ijos.2016.3

LeGoff, J., Péré, H., & Bélec, L. (2014). Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virology Journal*, *11*, 83. https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-83

Lima, L. R. P., Fernandes, L. E. B. C., Villela, D. A. M., Morgado, M. G., Pilotto, J. H., & de Paula, V. S. (2018). Co-infection of human herpesvirus type 2 (HHV-2) and human immunodeficiency virus (HIV) among pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV*, *30*(3), 378–382. https://doi.org/10.1080/09540121.2017.1378798

Organización Mundial de la Salud. (2017). Virus del herpes simple. Retrieved from http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus

Patton, M. E., Bernstein, K., Liu, G., Zaidi, A., & Markowitz, L. E. (2018). Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Among Pregnant Women and Sexually Active, Nonpregnant Women in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, *67*(10), 1535–1542. https://doi.org/10.1093/cid/ciy318

Sanchez-Aleman, M. A., Del Villar-Tapia, Y. G., Gutierrez, J. P., Garcia-Cisneros, S., Olamendi-Portugal, M. L., Herrera-Ortiz, A., … Conde-Glez, C. J. (2018, February 1). Heterogeneity of Herpes Simplex Virus Type 2 Seroprevalence from a National Probability Survey in Mexico, 2012. *Sexually Transmitted Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000702

Sauerbrei, A. (2016). Optimal management of genital herpes: current perspectives. *Infection and Drug Resistance*, *9*, 129. https://doi.org/10.2147/IDR.S96164

Secretaria de Salud. (2019). BoletínEpidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información, semana epidemiológica 44. *Gob.Mx*. Retrieved from http://www.gob.mx/salud/documentos/_oletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion

Shafii, T., & Burstein, G. R. (2009). The Adolescent Sexual Health Visit. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, *36*(1), 99–117. https://doi.org/10.1016/j.ogc.2009.01.001

Sharma, V., Mobeen, F., & Prakash, T. (2016). Comparative Genomics of Herpesviridae Family to Look for Potential Signatures of Human Infecting Strains. *International Journal of Genomics*, *2016*, 9543274. https://doi.org/10.1155/2016/9543274

Suazo, P. A., Tognarelli, E. I., Kalergis, A. M., & González, P. A. (2015). Herpes simplex virus 2 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent

disease. *Medical Microbiology and Immunology*, *204*(2), 161–176. https://doi.org/10.1007/s00430-014-0358-x

Tronstein, E., Johnston, C., Huang, M.-L., Selke, S., Magaret, A., Warren, T., … Wald, A. (2011a). Genital Shedding of Herpes Simplex Virus Among Symptomatic and Asymptomatic Persons With HSV-2 Infection. *JAMA*, *305*(14), 1441. https://doi.org/10.1001/jama.2011.420

Tronstein, E., Johnston, C., Huang, M. L., Selke, S., Magaret, A., Warren, T., … Wald, A. (2011b). Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *305*(14), 1441–1449. https://doi.org/10.1001/jama.2011.420

Tuset, M., López, E., Cervera, C., Moreno, A., & Miró, J. M. (2010). Características de los fármacos antivíricos frente a virus del grupo herpes actualización 2009. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*(3), 199.e1--199.e33. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.11.002

Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, F., Peeling, R., & Organization, W. H. (2013). *Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus*. World Health Organization. Retrieved from http://apps.who.int/iris/handle/10665/85343

Vargas-Duarte, J. J., López-Páez, M. C., Escovar-Castro, J. E., & Fernández-Manrique, J. (2009). *Evaluacion por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infectados con Leishmania (Leishmania) infantum Western blot, ELISA and indirect immunofluorescence test evaluation of Leishmania (Leishmania) infantum-infected dogs*. *Rev. salud pública* (Vol. 11).

Vergara-Ortega, D. N. (2014). *Determinación de los factores clínicos y sociodemográficos asociados a la diseminación anal y genital del Virus del Herpes Simplex tipo 2 en hombres que tienen sexo con hombres y que viven con VIH.* Escuela de Salud Pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública., Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernvaca Morelos, México.

Vergara-Ortega, D., Sevilla, E., Herrera, A., Torres, L., Salmerón, J., Lazcano, E., & Sánchez, M. (2018). Real time PCR to evaluate HSV-2 shedding from anal and genital samples among men who have sex with men, living with HIV. *Journal of Medical Virology*, *90*(4), 745–752. https://doi.org/10.1002/jmv.25003

Whitley, R. J., & Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet (London, England)*, *357*(9267), 1513–1518. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04638-9

Whitley, R., Kimberlin, D. W., & Prober, C. G. (2007). Pathogenesis and disease. In A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, & K. Yamanishi (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47449/

Anexo 1. Protocolo de trabajo para la realización de ELISA anti HSV-2 (gG2) (IgG) EUROIMMUN.

INSP/CISEI Unidad de Diagnóstico Poblacional Cuernavaca. Mor., México	Manual de operaciones del PROCESO: ELISA IgG anti-HSV-2 de EURO		Código: MPO-L1PA-P1-L6/48/18ELISA-EURO/HSV-2
	Dirección de Innovación en Métodos de Vigilancia y Control de las Enfermedades infecciosas		Responsable: Dr. Miguel A. Sánchez Alemán 24/01/19 (Mod.210319SGC no.)
			Hoja: 1 de 2

ELISA Anti HSV-2 (gG2) (IgG) EUROIMMUN

Hoja de Trabajo para documentar el Ensayo de **ELISA HSV-2 IgG de EUROIMMUN** **No. Placa**_____

Lote: _____ **Fecha caducidad:** _____ **Procesó:** _____ **Fecha Proceso:** _____

Antes de iniciar atemperar todos y cada uno de los reactivos a utilizar por lo que se necesitan sacar del refrigerador 30 minutos antes de iniciar.

Para muestras de DBS:

a) **Elusión de muestras DBS: De acuerdo al procedimiento descrito en el formato**: MOP-CISEI-L1PA-L6/24/16/Elu -DBS Fecha del proceso:_____.

b) **En este caso es necesario retirar el spot una vez eluido,** con la ayuda de una punta Sí____ No_____

c) **Procedimiento de la prueba de ELISA**

- Tipo de prueba a realizar: **Semicuantitativo**_____ o •**Cuantitativo**_____• ***Revise cuantos y cuales calibradores utilizará dependiendo del estilo de prueba a realizar en la siguiente hoja.***
- **Preparación de Tampón de lavado 1X:**
  a. Agregar _____(100) ml. de **Tampón de Lavado** 10X a _____(900) ml. de agua deshionizada y mezclar.
  b. Agregar al recipiente (previamente identificado) del lavador para utilizar en todos los lavados posteriores. Sí___ •No_____• Porque no lo hizo? explique: _____
- **Dilución de muestras se suero o plasma con EDTA, Heparina o Citrato:**
  1. Dilución de muestras 1:101 de c/u de ellas es decir agregar: _____ **(10) ul de suero o plasma**, a _____ **(1.0) ml. (Controles y calibradores Listos para usar)** de **Tampón de muestras** (**listo para usar**), **mezclar en Vortex**, reservar hasta agregar a la Placa (*Esta preparación se realiza en tubos de ensayo previamente identificados**). Usando una micropipeta (5-50ul) Finnpipette Labsystems, DH35850/ (100-1000ul) ND9416 4027) Sí ____ **No_____* *Especifique el equipo que _____

- **Muestras eluidas de DBS:**
  2. **A partir de los 400ul de muestra eluida** se toman (100ul) _____ y se agregan directamente a la placa antigenada.
  3. **Agregar o adicionar a la placa antigenada** _____ **(100) ul** de **cada Muestras de suero (1:101)**, controles y calibradores (listos para usar, mezclar bien en vortex) en el pozo que le corresponde según el mapa (*este mapa deberá estar preparado con anticipación**).
  4. Anotar la **hora/tem de inicio:** _____ /**Temp.**:_____de agregado/cargado de las muestras y la **hora/tem de finalización:** _____/**Temp.**:_____ de llenado de Placa (en no más de 15 minutos deberá realizarse el llenado de preferencia). (20-200ul) Finnpipette Labsystems, H7581 4027 Sí____ No_____. **Nota:** *Sé recomienda en el proceso de más de 48 pozos, para muestras DBS, realizar o agregar 250ul, de la muestra diluida en una placa previamente identificada y con su mapa correspondiente de cada muestras eluída, para posteriormente transferir los 100 ul de la misma con la ayuda de una pipeta multicanal de 8 o 12 canales.* Sí_____ No_____ realizado.
  5. **Cubrir la placa con la** cobertura **adhesiva**: Sí_____•No_____.• Porque no lo hizo? explique: _____.
  6. **Incubar la placa 30 min. _____ a temperatura ambiente (+18°C a 25°C)**: anotar la hora/tem **de inicio** de la **incubación:** _____/**Temp.**:_____ de la placa una vez cargada, y hora/tem **de finalización de incubación**: _____/**Temp.**:_____.
  7. Concluida la incubación: **retirar la cubierta adhesiva** y **lavar la placa 3 veces** con 300 ul (Manual) sí_____no____ o **450ul.** (**Automático**) sí_____ no_____ de **Tampón de lavado 1X** previamente *preparado y cargado al lavador automático* Lavador placas COMBIWASH HUMAN 18460, lo utilizó: **Sí_____ No. de programa:** _____o **No_____. **En caso de no ser así Especifique:_____
  8. **En caso de quedar excedentes ≥ 10ul. de Tampón de Lavado** es necesario **realizar:** *una absorción con 1 o dos golpes suaves, pero contundentes a la placa, para eliminar dichos restos.* Sí_____ No fue necesario_____.

- **Conjugado:**
  9. Una vez lavada la placa **agregar:** _____ **(100) µl. de Conjugado enzimático** (**listo para usar**) a **cada pozo**. (10-100ul) Multi-canal: Eppendorf Research plus, G20680B Sí____ No_____.
  10. **Cubrir** *con el adhesivo* la placa: Sí_____ o •No_____• Porque no lo hizo? explique: _____.
  11. **Incubar la placa 30 min. a temperatura ambiente (+18°C a 25°C)**: anotar la hora/tem **de inicio de la incubación:** _____/**Temp.**:_____ la hora/tem **de finalización de incubación:** _____/**Temp.**:_____
  12. Concluida la incubación: **retirar la cubierta adhesiva y lavar la placa 3 veces** con 300 ul (Manual) Sí____ No_____

Elaboró/Modificó/Adaptó	Revisó	Autorizó
Adaptó: Gabriela J. de la Cruz.	Santa G.C. 24/01/19	Dr. Miguel Sánchez Alemán 24/01/19

o **450ul.** (**Automático**) Sí____ No_____ de **Tampón de lavado 1X** previamente preparado y cargado al lavador automático*: Lavador placas COMBIWASH HUMAN 18460,* lo utilizó: **Sí_____ No. de programa: _____**o **No_____.

13. **En caso de no ser así especifique:_____
14. **En caso de quedar excedentes ≥ 10ul. de Tampón de Lavado** es necesario realizar: *una absorción con 1 o dos golpes suaves, pero contundentes a la placa, para* eliminar *dichos restos*. Sí_____ No fue necesario_____.

- **Sustrato:**
  15. Una vez lavada la placa **agregar** _____ **(100) ul de sustrato** (**listo para usar**) a **cada pozo** e
  16. **Incubar 15 min a temperatura ambiente (+18°C - 25°C), protegida de la luz solar:** anotar hora/tem **de inicio de incubación:** _____/**Temp.:**_____ y la hora/tem **de finalización de incubación:** _____/**Temp.:**_____ **de la placa con: Sustrato.** Micropipeta: (10-100ul) Multi-canal: Eppendorf Research plus, G20680B Sí____ No_____.
- **Stop/Finalización/Parada:**
  17. Concluida la incubación con el sustrato, **retirarla de la protección de la luz** y
  18. **Agregar:** _____ **(100) ul**. de sol. **STOP/Parada/Finalización** (**lista para usar**).
  19. **Anotar** la hora/tem de la **finalización de adición de STOP**: anotar la hora/tem **de finalización de agregado de Stop:** _____/**Temp.:**_____**.** Micropipeta: (10-100ul) Multi-canal: Eppendorf Research plus, G20680B Sí____ No_____.
- **Medición fotométrica** en los **primeros 30 min, una vez parada la reacción:**
  20. **Agitar ligeramente la placa,** antes de leerla para homogenizar la distribución del stop.
  21. **Realizar medición a una longitud de onda de**:_____(**450 nm**) y a una longitud de onda de referencia _____620nm y _____650nm.
  22. **Anotar la hora de inicio de lectura**: _____, Con la ayuda de equipo: Lector placas, marca: Labsystems Multiskan. Modelo: 352, serie: RS-232C, fecha de calibración: 27/05/2015.Sí_____ o **No_____.* *Especifique el equipo ha utilizado:_____.
  23. **Utilizó el software Ascent**: Sí _____ No____
  24. Una vez leído **copie y pegue** los *resultados a al archivo de Excel* y anote el nombre del archivo:_____.

CÁLCULO DEL RATIO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Revise que los valores de los controles y calibradores de la prueba cumplan con los valores (dentro de rango) establecidos por el fabricante: Válida Sí _____o **No Válida._____.

****En caso de ser –No Válida la placa deberá repetirse, ya que no cumplió con los criterios de validez.**

- **Semicuantitativo: se obtiene mediante el cálculo de una porción (Ratio) entre los valores de extinción de los controles o las muestras de pacientes y el valor de extinción del calibrador 2. Para calcular el ratio se aplica la siguiente formula:**

$$\frac{\textit{Extinción del control o las muestra de paciente}}{\textit{Extinción del calibrador 2}} = \textit{Ratio}$$

EUROIMMUN recomienda interpretar los resultados a partir del valor del Ratio de la siguiente manera:

Ratio	Resultado
<0.80	Negativo -
≥0.70 a <1.10	Dudoso/Zona Gris/Indeterminado
≥1.10	Positivo +

Foto de condiciones del programa de lavado para esta placa de ELISA de EUROIMMUN

En hoja siguiente:

Cheque condiciones de lavado, sin importar tanto el programa, VERIFIQUE que cumpla con las especificaciones del lavado, sí_____ o no_____.

Valores para la validación de la placa (ensayo semicuantitativo)		
	Valores de referencia	Intervalo valido
Calibrador 2	0,288 D.O	>0,140 D.O
Control positivo	3,2 razón o ratio	1,8 – 4,6 razón o ratio
Control Negativo	0,1 razón o ratio	0 – 0,7 razón o ratio

Anexo 2. Esquema de pipeteo.

ELISA Worksheet

Fecha/Date: _____ Prueba/Test: __EUROIMMUN HSV-2 ELISA IgG2 __

Realizó/Technician: _____SGC/GJC_____ Lote No./Lot Number: _____

Punto Corte/Cut-off: _____ Placa No./Plate Number: _____

INSP/CISEI

Lab. 1 P.A.

Dr. Miguel A. Sánchez A.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Calibra 2												A
B	Control+												B
C	Control -												C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

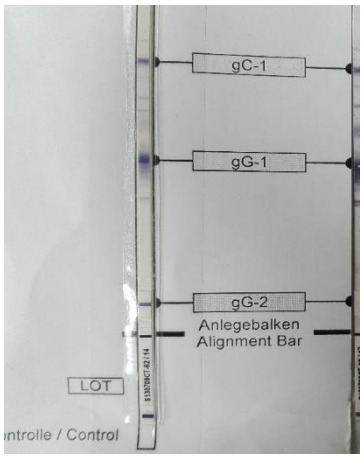
Anexo 3. Protocolo de trabajo para la realización de la técnica de Western blot EUROIMMMUN Anti-HSV-1/HSV-2 Gg-2 EUROLINE-WB (IgG).

Protocolo de la técnica de Western blot de EUROIMMUN Anti-HSV-1 / HSV-2 gG-2 EUROLINE-WB (IgG)

Para iniciar con el ensayo:

- Se lleva a cabo la dilución 1X de la solución universal de la cual se utilizan 15 ml por tira.
- Posteriormente se procede a un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos es decir las partes sobrantes de la tira, agregando 1.5ml de solución universal 1X a cada tira en la charola donde se llevará a cabo el ensayo.
- Se procede a una incubación en agitación durante 15min.
- Terminada la incubación se retira la solución universal de las tiras, después se añade 1.5ml de suero previamente diluido (1:51 con el tampón universal), seguida de una incubación de 30 min con agitación a temperatura 18-25°C.
- Terminada la incubación se retira el suero y se lavan las tiras agregando 1.5 ml de solución universal 1X en agitación por 5 min, por tres veces (retirar la solución universal 1X entre cada una).
- Concluido el lavado se agrega 1.5 ml de conjugado enzimático a cada tira (anti-IgG humano marcado con fosfatasa alcalina) 1X, se incuba durante 30 min en agitación a temperatura de 18-25°C.
- Terminado el periodo de incubación se lavan las tiras como anteriormente se describió. Se agrega 1.5ml de solución de sustrato a cada tira se incuba en agitación por 10 min a temperatura 18-25°.
- Por último, se extrae el sustrato y se lava cada tira agregando 1.5ml de agua destilada en agitación por 1 min terminado el tiempo se extrae el agua, esto se repite hasta completar tres veces con el fin de parar la reacción.

- Una vez terminado el proceso se dejan secar las tiras y se procede al análisis de resultados el cual se lleva con una tira control y un cuadro de interpretación de resultados que se proporciona el estuche comercial.



Tira control para interpretación de resultados. En un resultado positivo para HSV-2 se observa una banda en las zonas de la gG-2 además de la banda “control”. Para el caso de un resultado positivo a HSV-1 se deben presentar las bandas de gG-1 y gC1.

Anexo 4. Protocolo de trabajo para la realización de extracción y purificación de DNA mediante el estuche ZYMO RESEARCH Quick-DNA™

INSP/CISEI Unidad de Diagnostico Poblacional, Cuernavaca, Mor., México	Manual de operaciones del Proceso: Extracción y purificación de DNA ZYMO RESEARCH Quick-DNA™		Código:
	Dirección de Innovación en Métodos de Vigilancia y Control de las Enfermedades Infecciosas		Responsable: hoja: 2/2

Hoja de trabajo para documentar el proceso de extracción y purificación de DNA ZYMO RESEARCH Quick-DNA™

Lote: _____ Fecha de caducidad: _____ Usuario: _____
Fecha de procesamiento: _____

Antes de empezar temperar y homogeneizar las muestras a procesar.

Muestras a procesar:

1._____ 7._____
2._____ 8._____
3._____ 9._____
4._____ 10._____
5._____ 11._____
6._____ 12._____

La digestión se hará en tubos de 1.5 ml etiquetados de acuerdo al número de la lista anterior que le corresponde a la muestra que se procesaran en ese tubo.

1. Transferir 200 µl _____ de muestra_____ (especifique tipo de muestra, exudado vaginal, cultivo etc.) al tubo de 1.5 ml. El resto de la muestra regresarlo inmediatamente a su ubicación original.

2. Adicionar 200 µl _____buffer de biofluido y 20 µl _____ de proteinasa K, una vez agregados se homogenizan, vortex (10-15 segundos) ____, Centrifugar (spin) ____

3. Incubar a 55°C por 10 minutos: Hora de inicio_____ Hora de finalización _____

4. Adicionar un volumen de buffer de unión genómica (420 µl) _____ al tubo con la digestión, homogeneizar la mezcla, Vortex (10-15 s) _____, centrifuga (Spin) _____. Transferir el contenido a una columna de ZYMO (etiquetada adecuadamente) en un tubo colector (etiquetado adecuadamente). Centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, desechar el líquido y el tubo colector, este último se cambia por uno nuevo (etiquetado adecuadamente).

5. Añadir 400 µl _____ de buffer de pre-lavado de DNA a la columna. Centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.

6. Se agrega 700 µl _____ de buffer de lavado de DNA a la columna posteriormente centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.

7. Se agrega 200 µl _____ de buffer de lavado de DNA a la columna posteriormente centrifugar a 12 000 xg por 1 min _____, vaciar el líquido del tubo colector.

8. Transferir la columna al tubo de centrifuga, previamente etiquetado con la correspondiente muestra, una vez hecho esto, añadir 40 µl _____ de buffer de Elusión (Previamente calentado a 70°C _____).

9. Incubar por 7 min a temperatura ambiente (T=_____°):
   Hora de inicio_____
   Hora de finalización_____

10. Centrifugar a máximo nivel _____ por 1 minuto _____

11. Cuantificar en nanodrop cada una de las muestras y registrar la concentración en ng/ul.

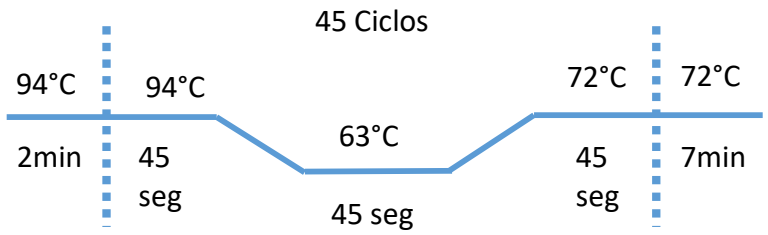
Muestra	Concentración	Muestra	Concentración
1.		7.	
2.		8.	
3.		9.	
4.		10.	
5.		11.	
6.		12.	

Anexo 5. Protocolo del PCR punto final para la amplificación de HSV-2.

- Esterilizar el área de trabajo, así como las pipetas, usar puntas y tubos estériles.
- Calcular los volúmenes y concentraciones a utilizar.
- Temperar las muestras procesar y los reactivos que se utilizaran.
- Se realiza una mezcla de reacción a un volumen de 25µl con los volúmenes y concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Mezcla de reacción para 1 muestra		
Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
***Buffer* KCl (10X)**	2.5	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	2.5	2.5 mM
dNTP´s (10mM)	0.8	0.32 mM
Taq polimerasa 5u/µl	0.5	0.1 u/µl
F1qVHS2 (10 µM)	2.5	1 µM
R2qVHS2 (10 µM)	2.5	1 µM
Agua	8.7	-----
DNA molde	5	<500ng
Volumen total	25	-----

- Las condiciones del termociclador son las siguientes:



Anexo 6. Protocolo para Electroforesis de gel de agarosa al 2%.

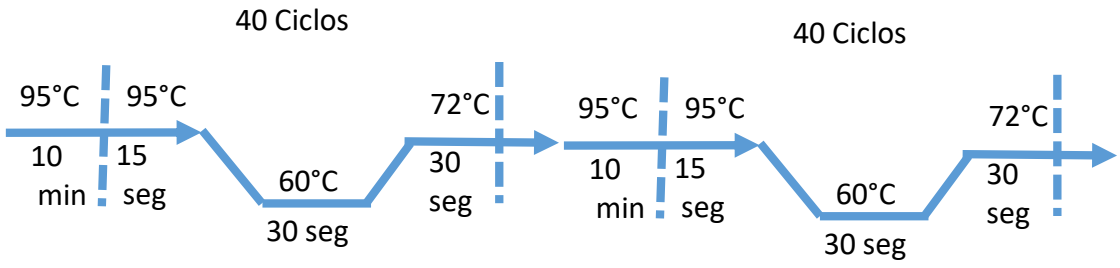
- Se pesan 0.6 gramos de agarosa y se miden 30 ml de buffer Tris-acetato-EDTA al 1 X.
- Mezclar ambos en un matraz Erlenmeyer, llevar al fuego hasta que la solución este totalmente transparente.
- Dejar atemperar un poco la solución y posteriormente agregar 1 µl de Bromuro de etidio y mezclar.
- Se arma la cámara de electroforesis y se vacía el contenido del matraz anteriormente preparado.
- Se coloca el peine en la cámara según se requiera el número de pocillos,
- Dejar polimerizar el gel, aproximadamente 10 min.
- Una vez polimerizado retirar los peines y las placas laterales.
- Llenar la cámara con buffer TAE 1X hasta cubrir el gel.
- Una vez hecho esto se cargan 5 µl de la muestra con 1µl buffer de carga (compuesto de bromofenol y glicerina) anteriormente mezclados.
- La primera muestra a colocar en el correspondiente pocillo del gel será el marcador de peso molecular y posteriormente en los pocillos siguientes se colocarán las muestras de DNA a visualizar.
- Una vez colocado las muestras en el gel, se cierra la cámara de electroforesis y se colocan los cables positivo y negativo.
- Encender la fuente de poder y correr el gel a 75mV por 30 minutos.
- Terminado el tiempo programado, apagar la fuente de poder, retirar los cables y la tapa para sacar el gel.
- con ayuda de un transiluminador o fotodocumentador se procede a visualizar el gel.
- Se documentan evidencias con fotografías.

Anexo 7. Protocolo del PCR en tiempo real para la amplificación de β-globina 161pb.

- Esterilizar el área de trabajo, así como las pipetas, usar puntas y tubos estériles.
- Calcular los volúmenes y concentraciones a utilizar.
- Temperar las muestras procesar y los reactivos que se utilizaran.
- Se realiza una mezcla de reacción a un volumen de 12µl con los volúmenes y concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Reactivo	Concentración final	Volumen final (12 µl)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	6
GH20 (Forward) [2.5mM]	0.075µM	0.36
R2qBETA (Reverse)	0.075µM	0.36
Agua libre de nucleasas (estéril)	CBP	4.28
DNA molde	≤ 500ng	1

- Las condiciones del termociclador son las siguientes:



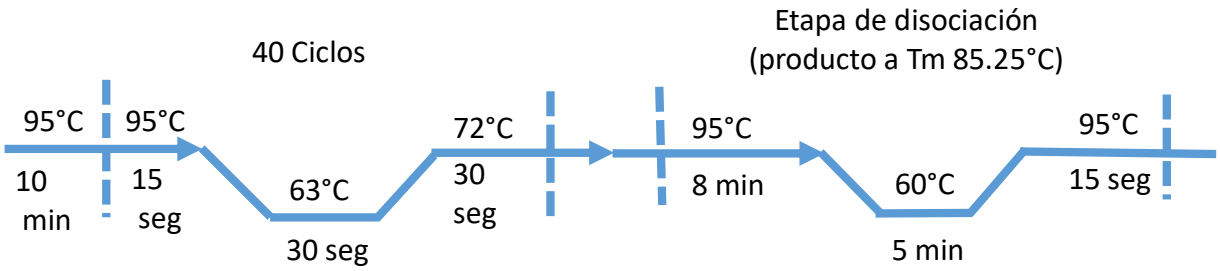
Anexo 8. Protocolo del qPCR en tiempo real para la amplificación de HSV-2 (151pb).

a

- Esterilizar el área de trabajo, así como las pipetas, usar puntas y tubos estériles.
- Calcular los volúmenes y concentraciones a utilizar.
- Temperar las muestras procesar y los reactivos que se utilizaran.
- Se realiza una mezcla de reacción a un volumen de 12µl con los volúmenes y concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Mezcla de reacción para 1 muestra		
Reactivo	**Concentración final**	**Volumen(µl)**
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	12.5
Oligonucleótido Forward	0.3µM	0.75
Oligonucleótido Reverse	0.3µM	0.75
Agua libre de nucleasas (estéril)	-	10
DNA molde	≤ 500ng	1
VOLUMEN TOTAL	---	25

- Las condiciones del termociclador son las siguientes:



Cuernavaca, Mor., a 11 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ, con el título del trabajo: **PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas,** como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO(_____)

A T E N T A M E N T E

M. EN C. PEDRO ROMERO GUIDO

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PEDRO ROMERO GUIDO | Fecha:2020-08-11 15:28:05 | Firmante

EVSUEamkIfXwm/OWG4yf9vnf/0qmzyZynx7N52wMvB1y40OpY80Z2TLC+kDhVLBKGrTVb2DPP4pVfDnQkokSoF20fFztQ9VfNJ7ixGX6aPKt3rhC8EriELCrwIFJE4fjOn3lOyHQ7OCYKfj9q6CYbYgXCXNSOJxAJmiiBepTlxEuH5XEkNcVcxo/7dFwrzhTC5U7PmImMdopqta8WF4IZB2Pve/87uGZDerVCrRmQl8s3oR/kNHqYxhEEiwFs8HPeyFGm9wOcwroiMhjZymypsxL9fgMGJ26ZUKnjxgMdzRlSz1X7FaZMuOPRaHtvPWcH/DI11yn3QUXyyLX1S7f/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

OJbjtR

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yC2xm30VJkqbctUQWw6qipd78TT3ylrs

Cuernavaca, Mor., 05 de octubre de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ**,** con el título del trabajo: **PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas,** como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (__X__) NO(_____)

A T E N T A M E N T E

_____
DRA. MARÍA LUISA CASTREJÓN GODÍNEZ

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2020-10-04 20:38:02 | Firmante

I3FCGRkh7IIpm8OBBbDMIIfrprene88zaJNl1kmcMvvPFyKEIsYRITpiLzBP2szix9wGkF1Hb1tXr9g4oluQEgXATJ7ezB9lyJV9bGaEhRO2145Ofilk6dsVWwMkrf4rNQjtubYf3Ws1NLjoBvcX7+DJEnwkpYzgsljag0l7/I2u52m+Sc2+C6hE66K/BB6uVjr8pcozffTw17yzJuIs46iB+QeBcvmrOpLNeV2pAEDLC7GUALZlxQm4nwdPEc9NL8fT8PP/0q20/BobAO7fle4/dESEDzmM9YqgSZWZODhzFMwPHkgZYAyqFLVJv4Kn5dbBWQ2o9kLwdwBNnTFcKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

9SUpwh

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XUnJtsFvhMB3jVvrkWOBlHAjI2Rdpdym

Cuernavaca, Mor., 09 de agosto de 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ**,** con el título del trabajo: **PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas,** como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (**X**) NO ( )

A T E N T A M E N T E

_____
DRA. DAYANA NICTÉ VERGARA ORTEGA

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAYANA NICTÉ VERGARA ORTEGA | Fecha:2020-08-09 15:36:16 | Firmante

0JIXnl2Ve3CDrPGk3XTnHeIPsa6MrlJnRY4AlAmwQmPm1DLvPzymH6tWpa5ARnEiC3ehWO2kKJ8TYI0XGn7dpGiQp8vtTHLqcAGWPsmPkJh6noiK76JW+1Fyb7Lgf2F+aKy670
NxzU/Iqn4hoX28DK/GOGG6uaCDPDrDaLkD67TUkn86rwvTIbFnHhFTxSz084wPyTOkyPuHj9//Y8lxm+xyUxj9Bj9riJaXzyJ5F5h4qzkfG96O1pPljY98iG1fp77mrXz16wTGGT9P6g
TEMA2SKpX4z7xME/dQEEh+y193fQ6xPYIfiGTcmhazQjWITFHVk+0pyeI3A3/qOcXQaw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

l6yFgc

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SujQ46qZ9ee4KNKhDcmy2u5zxBfpweI4

Cuernavaca, Mor.,01 DE OCTUBRE DEL 2020

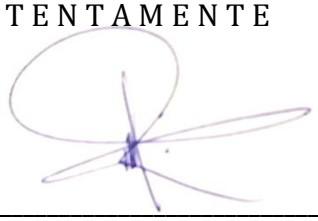
DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ**,** con el título del trabajo: **PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas,** como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (X) NO(_____)

A T E N T A M E N T E



DRA. GABRIELA ROSAS SALGADO

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA ROSAS SALGADO | Fecha:2020-10-01 14:01:32 | Firmante

qHng94r0nW7siJRea/Wv5sIGPDQMhgH0//TXKuKP18GokE+Y8TTn+qkjF8w6eexfCbUptxa4b4sJkVxBCK8SBt8Yy91cFVzC3fZ3AeY+4IPKMkYztAsoUg29o16CsjqHxwwJjicM3h2nYQHTWZU4A51iYDEJxQBGzlp36HhH6MZzro2QRZh/Unx829rnboStUulT2rFpG022vaqFElAZxtgtVYQopxoGkcXsxGv98HJxRhRimj/xSryrFu2elfdH+9b1z5yzrxrhEBDvQ3Vbdf9G/HUhbei9NqIrm+VJkJeR/AmUpXCIN1F2G4Dz3SHV5LekLiS0sA+hI3VCarielA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

i1FXn3

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/T6stVUzzoSupq961CAzUOxnPN6gKy40Q

Cuernavaca, Mor., 19 de agosto 2020

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UAEM
P R E S E N T E.

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: GABRIELA JUÁREZ DE LA CRUZ**,** con el título del trabajo: **PREVALENCIA Y DISEMINACIÓN GENITAL DEL VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN MUJERES EMBARAZADAS DE 10-24 AÑOS QUE ASISTEN A TRES CENTROS DE SALUD DE MORELOS.** Quien optó por la Modalidad de Titulación: **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas,** como lo marca el Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI (_____) NO(_____)

A T E N T A M E N T E

_____
DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MIGUEL ANGEL SANCHEZ ALEMÁN | Fecha:2020-08-19 14:38:29 | Firmante

BBJZezbz9h2bGSEGfXX0fmRLTC7BdrFw+BKvAYj/mGXcenHmX0QCM+lam84mrxNlH+mAkSBNe10hVf7aUEjGkUHK9TC0zvcHeALWXwdR7D1Dk37sZudYLuU7jWr9340g+iz+ODc8KW01uGm4tmoCuqLQx52jlTv0tkLPenoDfuKxdY9dVTiyyIIwfRVhZf3zQGw9xS+AfZGV/J0sIp/IofROdZKLT0b/u6fKxkVUYkR7V3bco1mu6OMzQDrR8PBabOp/EXZY4+ViE+D9qfLj2ajJJviePc+3mbWa7cs9xxBZzdUsrLoyAGXk40IXnYtmKI+HKfRrea/0vkZkwVcRyA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

KmMlqS

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VkB3ADFF7qcScvjOc4GQC5oXEFSgiMmw