

Grado en Farmacia  
Trabajo de Fin de Grado

---

**Diseño de marcadores moleculares para la  
detección simultánea de Virus Herpes Simple 1 y 2  
por PCR a tiempo real.**

---

**Autora:** Paula Gómez Moreno

**Tutor:** Leandro Jesús de León Guerra

**Área del conocimiento:** Microbiología

Curso 2020-2021

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Abstract .....	1
3. Introducción .....	2
3.1. Virus Herpes Simple .....	2
3.2. Estructura del virión .....	4
3.3. Patogenia, ciclo de replicación y latencia .....	7
3.4. Manifestaciones clínicas y epidemiología .....	9
3.5. Tratamiento y el problema de las resistencias .....	10
3.6. Diagnóstico y detección del VHS .....	11
4. Objetivos .....	13
5. Diseño de marcadores moleculares para la detección simultánea del VHS-1 y VHS-2 mediante PCR múltiple a tiempo real. ....	13
5.1. Material y métodos .....	13
5.2. Resultados y discusión .....	15
6. Conclusiones .....	20
7. Bibliografía .....	21

## 1. Resumen

---

Los herpesvirus (familia *Herpesviridae*) constituyen un grupo grande y heterogéneo de virus capaces de provocar múltiples manifestaciones clínicas en el ser humano. En concreto, el Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y el Virus Herpes Simple 2 (VHS-2) se han relacionado tradicionalmente con el herpes labial y genital, respectivamente. Sin embargo, en las últimas décadas se ha detectado un cambio en este patrón, aumentando las infecciones genitales por VHS-1. Esto plantea la necesidad de contar con técnicas de diagnóstico que permitan diferenciar al VHS-1 y al VHS-2, con el fin de dar un pronóstico acertado y seleccionar el tratamiento adecuado en cada caso.

En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica donde se resalta la importancia de un diagnóstico diferencial para VHS-1 y VHS-2. Posteriormente, mediante el manejo de herramientas informáticas y el uso de bases de datos disponibles con la información genética de los virus, se analizan los parámetros necesarios para el diseño de marcadores moleculares, que permitan llevar a cabo una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) múltiple a tiempo real (multiplex-qPCR) con sondas tipo TaqMan®. El desarrollo de estos marcadores moleculares para la detección simultánea y diferencial de estos virus puede ser de utilidad en investigación primaria. Esto permitiría aumentar el número de muestras a analizar sin la necesidad de recurrir a kits comerciales que suelen encarecer este tipo de investigaciones.

Palabras clave: Herpesvirus, qPCR, diagnóstico diferencial, VHS-1, VHS-2.

## 2. Abstract

---

Herpesviruses (*Herpesviridae* family) are a large and heterogeneous group of viruses responsible for causing a range of human diseases. Two species of this family, Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) and Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) have traditionally been associated with oral herpes and genital herpes, respectively. However, in recent decades, an increase in the incidence of genital herpes caused by HSV-1 has been noted. This evidence suggests the need for diagnostic techniques to specifically detect and distinguish between HSV-1 and HSV-2, intending to make a correct diagnosis and select the most appropriate treatment in each case.

This dissertation emphasises the importance of differential diagnosis between both viruses through a systematic review. Next, several molecular markers are proposed for developing a real-time PCR (qPCR) with TaqMan® probes, using databases and

informatics tools. Those molecular markers for the simultaneous detection of HSV-1 and HSV-2 could be useful in primary research, where the budget is usually limited. This would allow increasing the number of sample analyses, avoiding the use of expensive commercial diagnostic kits that often make research work more expensive.

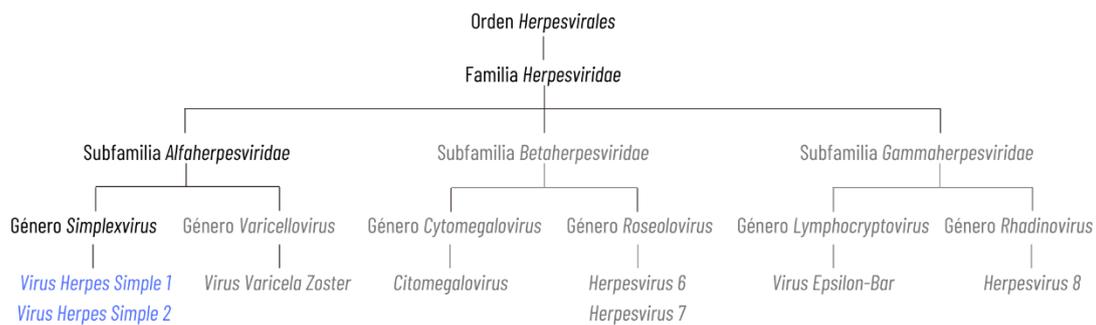
Key words: Herpesvirus, qPCR, differential diagnosis, HSV-1, HSV-2.

### 3. Introducción

---

#### 3.1. Virus Herpes Simple

Las dos especies de virus que serán objeto de estudio en este trabajo son: Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y Virus Herpes Simple 2 (VHS-2), ambos pertenecen al género *Simplexvirus*, englobado en la familia *Herpesviridae* [1]. Dentro de esta familia, se han descrito ocho especies que infectan a humanos, conocidas, de manera general, como herpesvirus [2, 3] (Figura 1).



**Figura 1:** Clasificación taxonómica de los herpesvirus que causan enfermedades en humanos. Se muestra en azul las especies del género *Simplexvirus*, el Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y el Virus Herpes Simple 2 (VHS-2), por ser objeto de estudio del presente trabajo.

Las infecciones por herpesvirus en el ser humano (Tabla 1) pueden causar lesiones mucocutáneas, respuestas inmunitarias patológicas o transformación neoplásica de las células infectadas [3]. Todos se caracterizan por provocar una primoinfección que puede ser sintomática o no, y entrar, posteriormente, en un estado de latencia con reactivaciones esporádicas.

**Tabla 1: Características de las infecciones producidas por herpesvirus en humanos.**

<b>Virus<sup>1</sup></b>	<b>Primoinfección</b>	<b>Reactivaciones</b>	<b>Latencia</b>	<b>Asociación con cáncer</b>
<b>VHS-1</b>	Gingivostomatitis Queratoconjuntivitis Herpes cutáneo Encefalitis Herpes genital	Herpes labial Queratoconjuntivitis Herpes cutáneo Encefalitis	Neuronas sensitivas	No
<b>VHS-2</b>	Herpes genital Herpes cutáneo Gingivostomatitis Meningoencefalitis Herpes neonatal	Herpes genital Herpes cutáneo Meningitis aséptica	Neuronas sensitivas	Cáncer cervical
<b>VVZ</b>	Varicela	Herpes zóster	Ganglios nerviosos sensitivos	No
<b>CMV</b>	Mononucleosis	-	Monocitos	No
<b>HHV6</b>	Roséola infantil Fiebre y otitis media Encefalitis	-	Linfocitos CD4	Linfoma raro de células B
<b>HHV7</b>	Roséola infantil	-	Linfocitos CD4	No
<b>VEB</b>	Mononucleosis Hepatitis Encefalitis	-	Linfocitos B	Varios tipos de linfomas y carcinomas
<b>HHV8</b>	-	-	-	-Sarcoma de Kaposi -Enfermedad de Castleman <sup>2</sup> -Linfoma de efusión primaria <sup>2</sup>

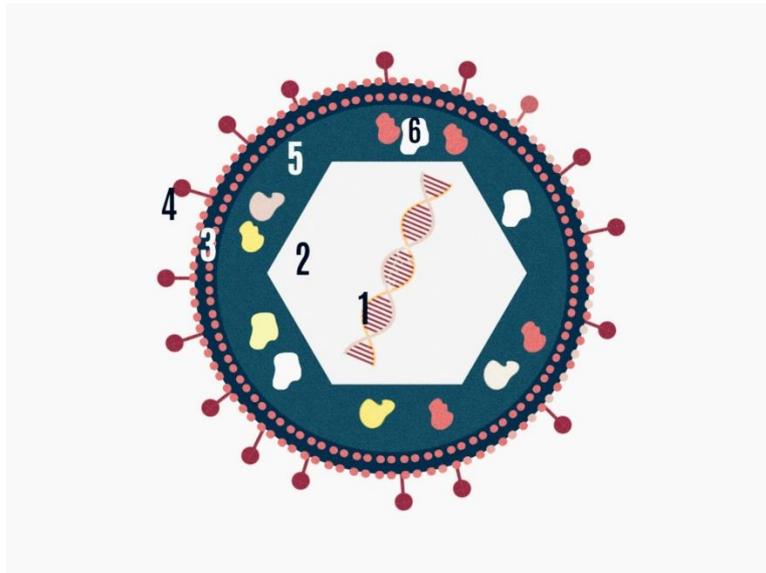
<sup>1</sup>VVZ: Virus Varicela Zoster; CMV: Citomegalovirus; HHV6: Human Herpes Virus 6; HHV7: Human Herpes Virus 7; VEB: Virus Epstein-Bar; HHV8: Human Herpes Virus 8.

<sup>2</sup>Pacientes inmunocomprometidos.

### 3.2. Estructura del virión

#### *Morfología de la partícula viral*

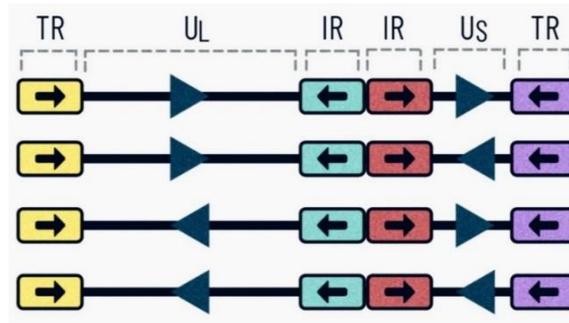
VHS-1 y VHS-2 son virus de ADN lineal bicatenario, que presentan una envuelta lipídica y tienen un diámetro de 150 a 200 nm. La estructura general del virión se muestra en la Figura 2 [2, 3, 4].



**Figura 2.** Morfología de VHS. El genoma (1) se encuentra dentro en una cápside icosaédrica (2), constituida por 162 capsómeros. En la envuelta lipídica (3) se insertan múltiples glicoproteínas (4). Entre la cápside y la envuelta se encuentra el tegumento (5), compuesto por 20 proteínas aproximadamente (6) y que representa el 40% de la masa del virus. Ver Tabla 3 para una descripción más detallada de las proteínas estructurales que componen el virión.

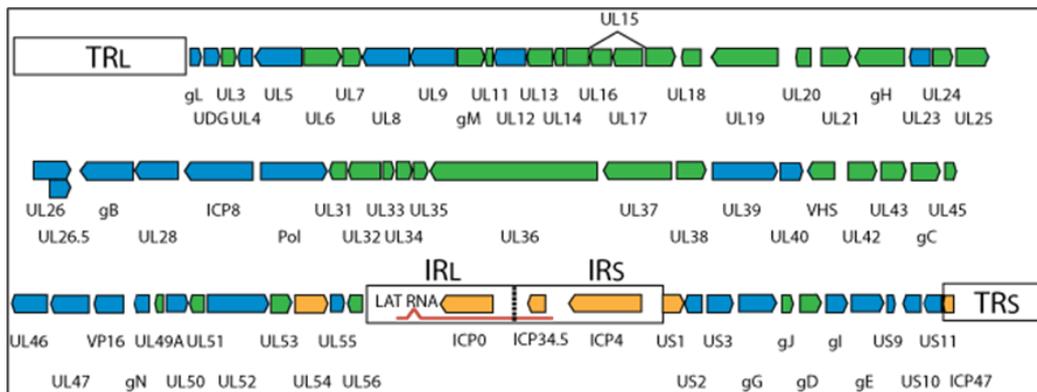
#### *Organización del genoma*

El genoma de las dos especies tiene un 40% de homología, que se incrementa a un 83% en las regiones codificantes. Ambos tienen un tamaño aproximado de 153 Kbp y un contenido de guanina-citocina del 68% [5]. Como se muestra en la Figura 3, el genoma está compuesto por dos segmentos únicos, que se denominan cortos ( $U_S$ ) y largos ( $U_L$ ), flanqueados por repeticiones de diferente longitud, que pueden ser terminales (TR) o internas (IR) [6].



**Figura 3.** Estructura básica del genoma de VHS. La organización del genoma permite la formación de cuatro isoformas, según la orientación de los segmentos  $U_L$  y  $U_S$ .

El genoma del VHS codifica para, aproximadamente, 75 proteínas estructurales (envuelta, tegumento y capsómeros que constituyen la cápside) y de la replicación (Figura 4) [7,8]. En la Tabla 2 se muestra un total de 36 genes esenciales, en su mayoría implicados en la replicación del virus [6] y las proteínas estructurales más relevantes del virión se resumen en la Tabla 3 [8].



**Figura 4.** El genoma del VHS contiene alrededor de 75 genes que se expresan de manera diferencial. En función de esto, los genes se agrupan en: genes tempranos (en naranja), que codifican proteínas que inducen la expresión de los genes intermedios (en azul), encargados de la replicación del ADN y de promover la expresión de los genes tardíos (en verde), que daría lugar, principalmente, a proteínas estructurales para la formación de una nueva cápside. La línea roja muestra los genes destinados al mantenimiento de la latencia en las terminaciones nerviosas [9]. Imagen recuperada de <https://viralzone.expasy.org/5756>

**Tabla 2. Genes esenciales codificados por el genoma de VHS.**

<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>
UL30	Subunidad catalítica del complejo ADN polimerasa	UL15	Subunidad ATPasa de la terminasa	UL35	Proteína pequeña de la cápside, interacciona con los microtúbulos y con la dineína
UL42	Subunidad procesadora del complejo ADN polimerasa	UL28	Subunidad de la terminasa	UL26	Proteasa de maduración
UL9	Helicasa	UL6	Proteína portal	UL26.5	<i>Scaffolding protein</i>
UL5	Componente del complejo ADN helicasa-primasa.	UL25	Proteína del tegumento	UL7	Proteína de asociación a la cápside intracelular
UL8	"	UL32	Participa en la localización de la cápside en el núcleo	UL11	Participa en la egresión de la cápside del núcleo y en la envuelta secundaria en el citoplasma
UL52	"	UL17	"	UL14	Interacciona con UL11 y regula a la proteína quinasa UL13
UL29	Proteína de unión a la cadena simple de ADN	UL33	Interacciona con la terminasa	UL16	"
UL23	Timidina quinasa	UL31	Proteína de la cápside que interacciona con la proteína de la matriz nuclear	UL21	-
UL39	Ribonucleótido reductasa (subunidad grande)	UL34	Proteína de la cápside que interacciona con la proteína del interior de la membrana nuclear	UL37	Interacciona con la proteína UL36
UL40	Ribonucleótido reductasa (subunidad pequeña)	UL19	MCP ( <i>Major Capside Protein</i> )	UL51	-
UL50	Desoxiuridin-trifosfato	UL18	Proteína componente de los capsómeros	UL13	Proteína quinasa serin-treonina
UL2	Uracil-DNA glucosilasa	UL38	"	UL54	Regulador de la expresión génica

**Tabla 3. Proteínas más relevantes presentes en la estructura del VHS.**

Localización	Nombre común de la proteína	Función
Envuelta	Glicoproteínas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM	Reconocimiento de la célula huésped, adhesión y fusión. Evasión de la respuesta inmune.
Tegumento <sup>1</sup>	$\alpha$ TIF <sup>2</sup>	Activador transcripcional, induce la transcripción de los genes inmediatos.
	VHS <sup>2</sup>	Degrada el ARN de la célula huésped para tomar control de la maquinaria de síntesis proteica.
	VP1-2 <sup>2</sup>	Interviene en el empaquetamiento del ADN viral en la cápside.
Cápside	MCP, TRI-1, TRI-2, SCP <sup>2</sup>	Estructural, forman los capsómeros.
	Proteasa	Participa en el ensamble de la cápside.
	Scaffolding	Estructural.

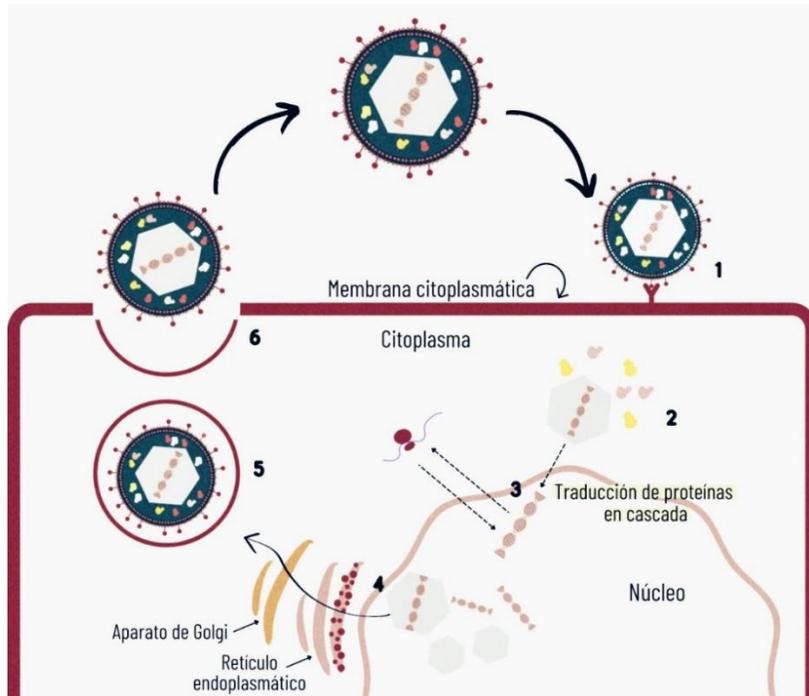
<sup>1</sup>En el tegumento podemos encontrar hasta 20 proteínas diferentes, en la tabla se muestran las más relevantes [8].

<sup>2</sup> $\alpha$ TIF:  *$\alpha$ -trans-inducing-factor*; VHS: *Virion host shutoff protein*; MCP: *Major Capsid Protein*; TRI-1: *Triplex monomer*; TRI-2: *Triplex dimer*; SCP: *Small Capsid Protein*.

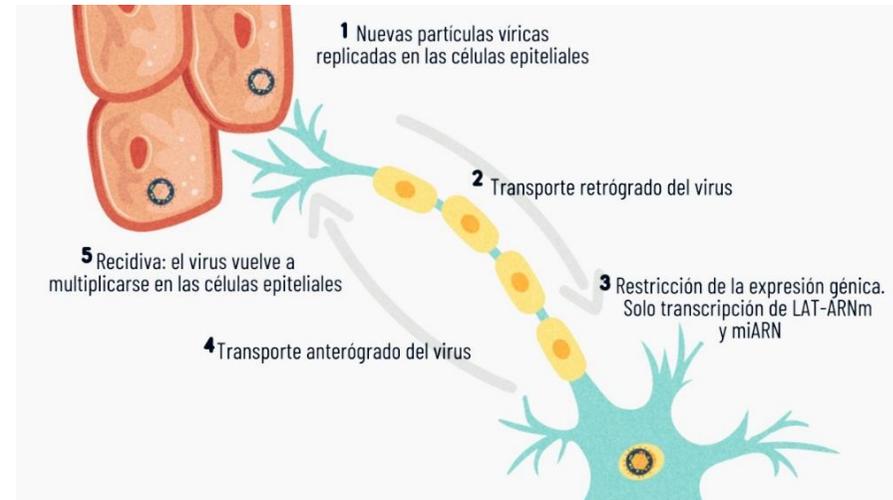
### 3.3. Patogenia, ciclo de replicación y latencia del VHS

La principal vía de transmisión de ambos virus es el contacto estrecho entre una persona infectada y un huésped susceptible. En una primoinfección, el virus infecta las células epiteliales – bien sea la zona genital u oro-bucal – y comienza un ciclo de replicación lítico, como se resume en la Figura 5 [2, 10]. Las partículas víricas replicadas en las células epiteliales alcanzan las terminaciones nerviosas, y llegan hasta el núcleo por transporte retrógrado, donde entrarán en estado de latencia [10] (Figura 6).

Estas infecciones duran de por vida y la persona infectada puede sufrir recidivas, con liberación de partículas víricas, que puede acompañarse o no de sintomatología [11]. Algunos factores desencadenantes de la reactivación son: estrés, exposición al sol, trastornos digestivos, menstruación, fiebre, alcohol, algunos medicamentos, entre otros [12].



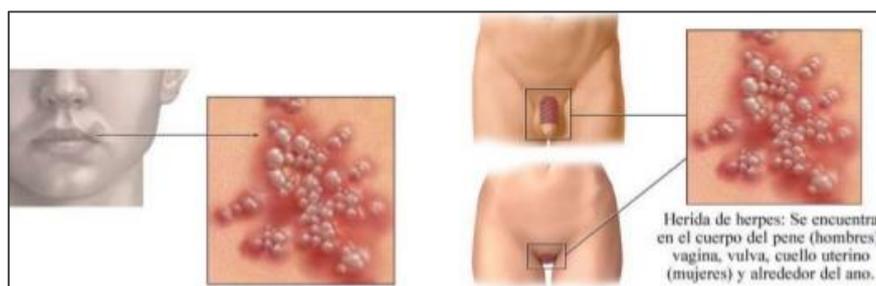
**Figura 5.** Ciclo de replicación del VHS. Las glicoproteínas gB y gC de la envuelta del VHS interactúan con los receptores heparán sulfato de la superficie de las células epiteliales (1), y se introduce en ella por fusión entre la envuelta y la membrana celular. La nucleocápside se dirige hacia el núcleo y las proteínas del tegumento quedan libres en el citoplasma (2). En el núcleo, a partir del genoma vírico, comienza la traducción de proteínas en cascada, mediante la transcripción de los genes tempranos, intermedios y tardíos (3). Una vez formada la cápside con el genoma incorporado, esta sale del núcleo atravesando el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (4), donde adquirirá la envuelta y sus proteínas. La nueva partícula vírica estará contenida en una vesícula (5), que se fundirá con la membrana plasmática, lo que permitirá la salida del virus (6). Este puede comenzar un nuevo ciclo de replicación en otra célula hospedadora [2, 10, 13].



**Figura 6.** Latencia de los VHS. Después de una primoinfección (1), las partículas víricas replicadas en las células epiteliales alcanzan las terminaciones nerviosas, y llegan hasta el núcleo por transporte retrógrado (2). A continuación, hay una restricción de la expresión génica (3), ya que solo se transcriben unas pocas moléculas de ARN conocidos como LAT-ARNm y algunos micro ARN (miARN) no codificantes, encargados de la regulación de la fase de latencia. El genoma vírico puede permanecer años en este estado. El virus puede llegar de nuevo a las células epiteliales por transporte anterógrado (4) y establecer un ciclo de replicación lítica, hablándose en este caso de recidiva o reactivación (5). En algunas ocasiones, podría no llegar a establecer este ciclo y ocurriría una excreción viral asintomática [10, 13, 14].

### 3.4. Manifestaciones clínicas y epidemiología

Como se resumió en la Tabla 1, tanto VHS-1 como VHS-2 son responsables de diferentes manifestaciones clínicas. La primoinfección más común por VHS-1 es la gingivostomatitis herpética, y la infección recurrente más frecuente son las lesiones orales, conocidas como herpes labial. Por otro lado, el VHS-2 es el principal causante del herpes genital [11] (Figura 7). Sin embargo, este patrón ha cambiado en las últimas décadas, detectándose un incremento en la incidencia de herpes genitales causados por VHS-1 [15, 16].



**Figura 7.** Manifestaciones clínicas más comunes producidas por VHS-1 y VHS-2. En la imagen de la izquierda se muestra un herpes labial; a la derecha, un herpes genital. Ambas lesiones se describen como una agrupación de vesículas que se disponen sobre una base eritematosa que pueden evolucionar a úlceras [5]. Imagen recuperada de <https://es.slideshare.net/juancarlos891/herpes-virus-33066496>

Entre las complicaciones más graves producidas por VHS cabe destacar la infección neonatal, cuando el virus es adquirido por el bebé durante el paso a través del canal del parto si la madre tiene un herpes genital [11]. Tradicionalmente, esta complicación era solo ocasionada por el VHS-2, aunque, desde hace unos años, se ha detectado que el 25% de las infecciones neonatales son producidas por VHS-1 [17]. Este es un ejemplo de la relevancia clínica del cambio de agente etiológico en las infecciones por VHS.

Se ha observado que el VHS y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tienen una relación recíproca. Los pacientes seropositivos para VIH tienen mayor probabilidad de adquirir el VHS, en concreto, la infección por VHS-2 es una de las más frecuentes en estos pacientes (60-90%). Por otro lado, las personas que tengan una infección por VHS pueden contraer y transmitir el VIH con mayor facilidad. Además, las manifestaciones clínicas del VHS cuando hay coinfección con VIH son más severas y las recidivas más frecuentes [3, 18].

El VHS es de distribución mundial y hay una elevada prevalencia de personas asintomáticas. La OMS estima que, en 2016, el número de personas menores de 50 años infectadas por VHS-1 eran 3.700 millones (67%) en todo el mundo. En ese mismo año, el número de personas infectadas por VHS-2, entre 15 y 50 años, era de 491 millones (13%) [18].

Considerando al VHS como agente causante de infección de transmisión sexual (ITS) – sin hacer diferencias entre el tipo 1 y 2 – la OMS detectó 500 millones de personas en todo el mundo con herpes genital. Esto lo convierte en la ITS más común a nivel mundial [19].

Los resultados de un estudio observacional retrospectivo, llevado a cabo entre 2016 y 2019 en España, mostraron que el 14% de las ITS diagnosticadas en este periodo fueron un herpes genital, de los cuales el VHS-1 era el causante del 47.3% [16]. Esto demuestra la relevancia de esta ITS y del cambio en la epidemiología del herpes genital.

### **3.5. Tratamiento y el problema de las resistencias**

Las infecciones por VHS no tienen cura y en la actualidad no se dispone de vacunas efectivas para el control de la enfermedad, por lo que conocer y aplicar adecuadamente las medidas de prevención (protección sexual, nacimiento por cesáreas en madres infectadas, extremar las medidas higiénicas en asistencia durante el parto, etc.), es fundamental para reducir la incidencia de infecciones por estos virus [11, 18].

Una vez que se ha producido el contagio, el objetivo del tratamiento será reducir la duración e intensidad de los síntomas durante la primoinfección o recidivas, acelerar la curación de las lesiones y disminuir la excreción de nuevas partículas virales y, por tanto, reducir la transmisión [11].

Los principios activos disponibles son: aciclovir, penciclovir, famciclovir (profármaco del penciclovir) y valaciclovir (profármaco del aciclovir).

Se han detectado resistencia a aciclovir o valaciclovir por mutaciones en los genes UL23 (timidina quinasa) y UL30 (subunidad de la ADN polimerasa). Según algunas investigaciones, existe una prevalencia de la resistencia a aciclovir del 1% en pacientes inmunocompetentes, 5% en pacientes seropositivos para VIH y hasta un 30% en pacientes receptores de células madre hematopoyéticas [20, 21].

Otros estudios ponen de manifiesto que las mutaciones relacionadas con la resistencia a antivirales son diferentes en cada tipo de virus [20]. Por ello, es conveniente la identificación del agente etiológico antes de comenzar un estudio genotípico para la identificación de cepas resistentes a antivirales. Esto reafirma la necesidad de un diagnóstico diferencial entre VHS-1 y VHS-2.

### **3.6. Diagnóstico y detección del VHS**

En el presente trabajo se ha mencionado la necesidad e importancia de hacer un diagnóstico diferencial para VHS-1 y VHS-2. Hay varias técnicas que permiten confirmar la presencia de VHS tras la exploración física (Tabla 4) [20, 22, 23], pero la diferenciación entre ambos tipos de virus solo es posible mediante el uso de: i) métodos serológicos que detectan anticuerpos IgG específicos contra la glicoproteína C (gG) del VHS-1 o del VHS-2, con varios kits comerciales aprobados por la FDA (U.S. *Food and Drug Administration*), que utilizan técnicas como ELISA, Western Blot, *point-of-care testing* (POCT), luminex® o quimioluminiscencia, y ii) técnicas moleculares (PCR) que detectan específicamente la presencia de ADN viral en la muestra analizada. Entre las dianas más utilizadas para la detección por PCR se encuentran los genes conservados que codifican para la glicoproteína B (gB), glicoproteína D (gD), helicasa, ADN polimerasa o timidina quinasa [20, 22].

Existen dos kits comerciales, basados en la técnica de PCR, capaces de diferenciar VHS-1 y VHS-2, aprobados por la FDA: “MultiCode®-RTx HSV1&2 Kit” y “BD ProbeTec™ Herpes Simplex Viruses (HSV1&2) Q<sup>x</sup> Amplified DNA Assays”. Ambos están autorizados exclusivamente para su uso con muestras de pacientes mujeres sintomáticas, mayores de 18 años y con lesiones genitales [24, 25].

El primero de los kits se basa en la tecnología MultiCode®-RTx y permite detectar de manera diferencial el VHS-1 y VHS-2 en una sola reacción y en un tiempo aproximado de 4 horas. El kit incluye los reactivos necesarios, así como el control positivo, pero se debe contar en el laboratorio con instrumental específico para la lectura de resultados [24, 26].

El segundo kit utiliza la tecnología SDA (*Strand Displacement Amplification*), y se trata de una técnica de amplificación isotérmica. En este caso es necesario hacer dos reacciones en tubos separados, uno que identificaría al VHS-1 y otro para el VHS-2. El tiempo aproximado de la reacción es de 2 horas y 40 minutos [25].

Ambos kits de detección se basan en técnicas rápidas y de fácil interpretación, aunque presentan el inconveniente de que solo están aprobados para un grupo de pacientes concreto. Otra limitación es que el segundo kit requiere dos reacciones, por lo que el número de manipulaciones es mayor, aumentando la probabilidad de obtener un resultado erróneo. Además, optar por kits comerciales en investigación primaria conlleva usar reactivos y equipos específicos, que es un factor a tener en cuenta si el número de muestras a analizar es elevado y el presupuesto es limitado.

**Tabla 4. Pruebas diagnósticas más utilizadas ante la sospecha de infección por VHS.**

Prueba	Descripción	Comentarios
Cultivo viral (CV)	Aislamiento del virus en líneas celulares sensibles y observación de ECP <sup>1</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hasta ahora, prueba <i>gold standard</i>, pero la han superado los métodos serológicos y moleculares por sus ventajas (mayor rapidez y sensibilidad).</li> <li>- Elevada especificidad, pero la sensibilidad es muy dependiente a las condiciones de recogida y transporte de la muestra.</li> <li>- Requiere tiempo (hasta 7 días), aunque puede acortarse a 24-48 horas con la técnica del Shell Vial<sup>2</sup>.</li> </ul>
Serología	Método indirecto que detecta anticuerpos IgG contra VHS.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prueba rápida, barata y automatizada o semiautomatizada.</li> <li>- Normalmente, los anticuerpos son detectables a las 6-8 semanas de la infección. Aunque no siempre hay elevación de anticuerpos a niveles detectables.</li> </ul>
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Amplificación de la una región concreta del genoma viral.	- Técnica rápida y sencilla. Los resultados son menos dependientes de las condiciones de recogida y transporte de la muestra.
Detección de antígenos	Método directo que detecta una partícula antigénica del virus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método rápido, con mayor sensibilidad que el CV, pero menos que la PCR.</li> <li>- Normalmente solo utilizado cuando no hay métodos moleculares disponibles.</li> <li>- Necesario la presencia de lesión.</li> <li>- Métodos utilizados: IFI<sup>1</sup>, ELISA<sup>1</sup>.</li> </ul>
Tinción de Papanicolau	Examen en fresco	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Observación de células gigantes de citoplasma deslustrado con inclusiones intranucleares de Cowdry (tipo A) o células sincitiales gigantes.</li> <li>- Barato, pero poco sensible e inespecífico.</li> </ul>
Prueba de Tzank		

<sup>1</sup>ECP: Efecto Citopático; IFI: Inmunofluorescencia Indirecta; ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima.

<sup>2</sup>La técnica del Shell-vial combina el cultivo celular, la centrifugación a baja velocidad y la utilización de anticuerpos monoclonales, lo que incrementan la precisión y rapidez del diagnóstico.

## 4. Objetivos

---

El cambio de agente etiológico que tradicionalmente provocaba las lesiones oro-bucal y genitales producidas por VHS ha motivado la búsqueda de técnicas que permitan hacer un diagnóstico diferencial fiable, necesario para dar un buen pronóstico y decidir el mejor plan de tratamiento.

Por ello, el trabajo pretende proponer varios marcadores moleculares que permitan la detección e identificación del VHS-1 y VHS-2, a través de una PCR múltiple a tiempo real, de manera rápida y sencilla, y con una elevada sensibilidad y especificidad. Esto permitirá aumentar el número de muestras a analizar sin encarecer el trabajo de investigación, ya que se evitaría el uso de kits comerciales.

## 5. Diseño de marcadores moleculares para la detección simultánea del VHS-1 y VHS-2 mediante PCR múltiple a tiempo real.

---

### 5.1. Material y métodos

#### *Revisión bibliográfica*

Inicialmente se llevó a cabo una búsqueda en Google Scholar de documentos publicados por diferentes sociedades mediante las siguientes ecuaciones de búsqueda: “Infecciones por Virus Herpes Simple” “*Herpes Simplex Virus AND Structure*” “*Herpes Simplex Virus AND Replication cycle*”. Luego, se buscó temas más concretos con palabras clave como: *epidemiology, treatment, antiviral resistance, diagnosis, PCR, serological diagnosis*. Solo se introdujo como filtro que el idioma fuera español o inglés, y no se limitó por fecha de publicación. También, en la plataforma ClinicalKey Student, de la editorial Elsevier, y en la base de datos PubMed, a través del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se introdujo “Virus Herpes Simple” y se filtraron únicamente libros. Además, se analizaron las referencias bibliográficas de los documentos seleccionados por este procedimiento de búsqueda.

Tras la revisión de los resúmenes y conclusiones de las publicaciones encontradas, se seleccionaron 31 referencias. El análisis de los datos se enfocó, en primer lugar, en los aspectos generales de la microbiología y epidemiología del VHS. Posteriormente, se estudió con más profundidad las pruebas diagnósticas actuales y técnicas de detección e identificación del VHS-1 y VHS-2, por su relevancia en el presente trabajo.

### *Selección de genes para el diseño de cebadores y sondas*

A partir de las secuencias disponibles en la base de datos NCBI, inicialmente se escogieron como posibles dianas para el diseño de marcadores moleculares los genes gB, gD, helicasa, ADN polimerasa y timidina quinasa, que contienen secuencias conservadas [20]. Posteriormente, los dos últimos fueron descartados por la existencia de evidencias que identifican mutaciones frecuentes en estos genes, relacionadas con problemas de resistencia a antivirales [20, 21].

### *Diseño de cebadores y sondas*

Se seleccionaron cuatro secuencias publicadas en NCBI de cada gen – dos secuencias por cada virus – y su similitud fue estudiada con la herramienta EMBOSS Needle (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>). Las secuencias de VHS-1 y VHS-2 se alinearon con ApE-A plasmid Editor Software (v.2.0.61) para identificar regiones genómicas idénticas y variables, que se emplearían en el diseño de cebadores y sondas TaqMan®, respectivamente.

A partir de las regiones seleccionadas se diseñaron los cebadores y las sondas, teniendo en cuenta los parámetros descritos en la Tabla 5 [27, 28].

**Tabla 5. Parámetros recomendados en el diseño de marcadores moleculares para qPCR**

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. El tamaño de los cebadores estará entre 18 – 24 pares de bases (bp).</li><li>2. La Temperatura de fusión (<math>T_m</math>) debe estar entre los 50-70°C y no debe haber una diferencia de más de 2°C entre los cebadores.</li><li>3. El porcentaje de guanina-citocina (%GC) debe ser próximo a 50%.</li><li>4. Evitar repeticiones largas de un mismo nucleótido.</li><li>5. Es preferible que el extremo 3' empiece por G o C, para aumentar la especificidad.</li><li>6. El tamaño del producto de amplificación para qPCR no debe superar los 200bp.</li></ol> |
|--|

Una vez seleccionados los cebadores y sondas, se estudió las posibles estructuras secundarias que se puedan formar (estructura tallo-bucle, dímeros y heterodímeros) cuando los oligonucleótidos son añadidos en una misma mezcla de reacción, ya que estas podrían comprometer la eficiencia de la amplificación. Para este paso se utilizó el software IDT™ OligoAnalyzer tool v.3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>). Los parámetros estudiados en este punto fueron: i) la temperatura más alta a la que se forman

estructuras tallo-bucle, que debe estar por debajo de la temperatura de *annealing* propuesta para cada reacción, y ii) el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) necesario para la formación de dímeros y heterodímeros (se recomienda que no sea inferior a -10 kcal/mol [29]).

#### *Análisis global y BLAST*

Finalmente, se compararon 20 secuencias de cada gen seleccionado para el diseño de los marcadores – 10 para cada tipo de virus –, publicadas en NCBI por diferentes autores, con el objetivo de obtener la máxima variabilidad entre ellas. En este paso, se utilizó la herramienta para alinear secuencias que ofrece el Software Unipro UGENE (v.38.1).

Finalmente, se realizó un análisis BLAST en la base de datos NCBI de los marcadores propuestos, para detectar homología con otras regiones genómicas con el fin de asegurar la especificidad de las secuencias.

## **5.2. Resultados y discusión**

El aumento de los casos de herpes genital causados por VHS-1 rompe con el patrón tradicional, en el que se relacionaba el VHS-1 exclusivamente con lesiones oro-bucales y VHS-2 con lesiones genitales. Esta tendencia pone de manifiesto la importancia de dar un diagnóstico preciso sobre el agente etiológico. El presente trabajo establece el diseño de marcadores moleculares para llevar a cabo la detección de VHS-1 y VHS-2 de forma simultánea mediante qPCR. Siguiendo la metodología descrita en la sección Material y Métodos, se han propuesto cuatro sets para llevar a cabo reacciones de qPCR con sondas TaqMan®, utilizando como diana los genes que codifican para las proteínas gB, Helicasa y gD (Tabla 6).

Los marcadores moleculares propuestos cumplen con los parámetros generales de longitud, %GC y  $T_m$ , establecidos para el diseño de cebadores y sondas. Así mismo, los valores estudiados para la formación de posibles estructuras secundarias también cumplen con las recomendaciones, salvo las sondas de la propuesta 4 (gD), que tienen valores de  $\Delta G$  inferiores a -10 kcal/mol en la formación de dímeros, sin embargo, sería necesario estudiar el rendimiento de la reacción, así como sensibilidad y especificidad de estos marcadores, antes de rechazar esta propuesta.

**Tabla 6. Características de los marcadores moleculares propuestos para la detección de VHS-1 y VHS-2 por qPCR.**

Identificador	Secuencia	Hebra	Posición amplificada <sup>1</sup>	Información general	Estructuras secundarias		
					Tallo-bucle	Dímeros	Dímeros con otros oligonucleótidos
<b>Propuesta 1 - Gen: Glicoproteína B</b>							
VHS-gB-For	5'-CTACGTGTA CTTGAGGAGTAC-3'	Forward	HSV1, 53836-53853 HSV2, 54168-54185	22bp 50% GC T <sub>m</sub> = 55°C	41.1°C	-6.76 kcal/mol	-6.91 kcal/mol <sup>2</sup> -6.94 kcal/mol <sup>3</sup> -6.91 kcal/mol <sup>4</sup> -4.67 kcal/mol <sup>5</sup> -3.9 kcal/mol <sup>6</sup> -5.02 kcal/mol <sup>7</sup>
VHS-gB-Rev	5'-CGCTGTCCTTGATCTCGTG-3'	Reverse	HSV1, 53705-53721 HSV2, 54037-54053	19 bp 58% GC T <sub>m</sub> = 56°C	19.9°C	-4.62 kcal/mol	
VHS1-gB-Sonda	5'-FAM-TCCCCCTGGAGGTGTACAC-BHQ1-3'	Forward	HSV1, 53726-53743	19 bp 63% GC T <sub>m</sub> = 59°C	44.1°C	-10.24 kcal/mol	
VHS2-gB-Sonda	5'-VIC-GACCACGAGTTTGTGCC-BHQ1-3'	Forward	HSV2, 54072-54089	18 bp 61% GC T <sub>m</sub> = 57°C	35.1°C	-3.61 kcal/mol	
Longitud total del producto de amplificación: 112 bp							
<b>Propuesta 2 - Gen: Helicasa</b>							
VHS-He1-For	5'-GATTAACGCCCTGTACCAC-3'	Forward	HSV1, 14309-14328 HSV2, 14430-14449	19 bp 50% GC T <sub>m</sub> = 56°C	27.3°C	-4.85 kcal/mol	-4.95 kcal/mol <sup>2</sup> -3.61 kcal/mol <sup>3</sup> -5.02 kcal/mol <sup>4</sup> -5.13 kcal/mol <sup>5</sup> -3.61 kcal/mol <sup>6</sup> -8.71 kcal/mol <sup>7</sup>
VHS-He1-Rev	5'-GTTGCAGATGAGGTACGTGAG-3'	Reverse	HSV1, 14160 - 14180 HSV2, 14281 - 14301	21 bp 52% GC T <sub>m</sub> = 56°C	10.3°C	-7.05 kcal/mol	
VHS1-He1-Sonda	5'-FAM-CTTCGAGCACCAGAACTGC-BHQ1-3'	Forward	HSV1, 14210 - 14229	20bp 55% GC T <sub>m</sub> = 57°C	32.2°C	-6.76 kcal/mol	
VHS2-He1-Sonda	5'-VIC-CTGGAGTCCACCTTCGAACA-BHQ1-3'	Forward	HSV2, 14342 - 14361	20 bp 55% GC T <sub>m</sub> = 58°C	30.1°C	-10.65 kcal/mol	
Longitud total del producto de amplificación: 152 bp							

<b>Propuesta 3 - Gen: Helicasa</b>							
VHS-He2-For	5'-CGTACCTCATCTGCAACCGCAC-3'	Forward	HSV1, 14155 - 15176 HSV2, 14276 – 14297	22 bp 59% GC Tm = 62°C	43.6°C	-7.06 kcal/mol	-7.26 kcal/mol <sup>2</sup> -3.61 kcal/mol <sup>3</sup> -6.68 kcal/mol <sup>4</sup> -6.21 kcal/mol <sup>5</sup> -8.03 kcal/mol <sup>6</sup> -8.13 kcal/mol <sup>7</sup>
VHS-He2-Rev	5'-GGCCGTA CTCCAGCACCTTCATG-3'	Reverse	HSV1, 14048 - 14070 HSV2, 14169 – 15191	23 bp 61% GC Tm = 63°C	29.3°C	-9.28 kcal/mol	
VHS1-He2-Sonda	5'-FAM-CGCCTCTCGTATAGCTGGG-BHQ1-3'	Forward	HSV1, 14120 – 14138	19 bp 63% GC Tm = 58°C	38.8°C	-6.34 kcal/mol	
VHS2-He2-Sonda	5'-VIC-TGGAGCACGAGTTCGGGAAC-BHQ1-3'	Forward	HSV2, 14194 - 14213	20 bp 60% GC Tm = 61°C	35.3°C	-5.19 kcal/mol	
Longitud total del producto de amplificación: 129 bp							
<b>Propuesta 4 - Gen: Glicoproteína D</b>							
VHS-gD-For	5'-CGTCAGCGAGGATAACCTG-3'	Forward	HSV1, 138923-138940 HSV2, 141520-141537	19bp 58% GC Tm = 56°C	37.6°C	-4.67 kcal/mol	-6.53 kcal/mol <sup>2</sup> -6.75 kcal/mol <sup>3</sup> -6.75 kcal/mol <sup>4</sup> -6.68 kcal/mol <sup>5</sup> -6.68 kcal/mol <sup>6</sup> -9.82 kcal/mol <sup>7</sup>
VHS-gD-Rev	5'-CTCCGTCCAGTCGTTTATCTTC-3'	Reverse	HSV1, 138997-19013 HSV2, 141594-141610	22bp 50% GC Tm = 56°C	28.2°C	-3.61 kcal/mol	
VHS1-gD-Sonda	5'-FAM-GTTTGAGACCGCCGGCAGTAC-BHQ1-3'	Forward	HSV1, 138968-138985	22bp 64% GC Tm = 64°C	38.7°C	-16.03 kcal/mol	
VHS2-gD-Sonda	5'-VIC-GCCTTCGAGACCGGGGTACG-BHQ1-3'	Forward	HSV2, 141562-141579	21bp 71% GC Tm = 65°C	43.3°C	-16.5 kcal/mol	
Longitud total del producto de amplificación: 97 bp							

<sup>1</sup>GenBank accession numbers: X14112 (genoma completo del VHS1), Z86099 (genoma completo del VHS2).

<sup>2</sup>Formación de heterodímeros entre primer forward – primer reverse; <sup>3</sup>Formación de heterodímeros entre primer forward – sonda HSV1; <sup>4</sup>Formación de heterodímeros entre primer forward– sonda HSV2; <sup>5</sup>Formación de heterodímeros entre primer reverse – sonda HSV1; <sup>6</sup>Formación de heterodímeros entre primer reverse – sonda HSV2; <sup>7</sup>Formación de heterodímeros entre sonda HSV1 – sonda HSV2.

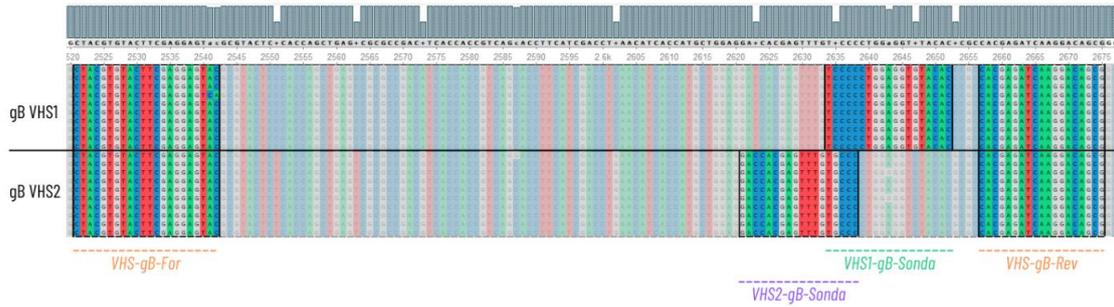
Teniendo en cuenta que los marcadores moleculares propuestos cumplen con los requisitos citados, estos cebadores nos permitirían amplificar tanto el VHS-1 como el VHS-2, ya que las regiones seleccionadas para el diseño de los cebadores son idénticas en los dos virus, como se comprueba en el alineamiento de las 20 secuencias publicadas por diferentes autores (Figura 8).

Además, las sondas propuestas se diseñaron en regiones donde se encontró, al menos, una diferencia de dos pares de bases entre ambos virus (Figura 8). Al tratarse de sondas TaqMan®, cada una estaría marcada por un fluoróforo en su extremo 5', que emitiría una señal diferente, según el tipo de virus que se amplifique. Se propone utilizar 6-FAM™ para las sondas de VHS-1 y VIC™ para el VHS-2, ya que emiten a diferentes longitudes de onda (522 nm y 554 nm, respectivamente) [30] y las señales serían registradas por diferentes canales de lectura del termociclador. Para disminuir los posibles problemas de ruidos durante la lectura, el extremo 3' estaría marcado por un desactivador de la emisión *quencher* no fluorescente (NFQ), como el Black Hole Quencher® (BHQ®). Se recomienda el uso de BHQ®-1 tanto con 6-FAM™ como con VIC™ [31].

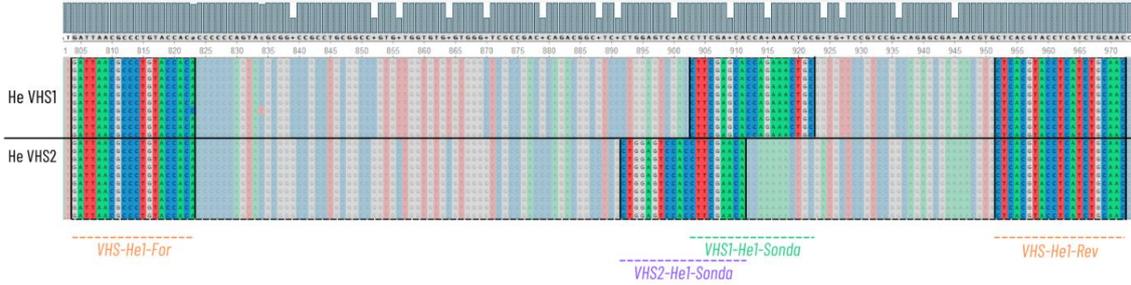
Para valorar la eficacia de los cebadores propuestos, se evaluarían gradientes de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  a partir de las temperaturas de *annealing* que se indican en la Tabla 7 [28], con el fin de determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo el proceso de amplificación. Se utilizará ADN de VHS-1 y VHS-2 de colección de referencia como controles positivos, y ADN de otros herpesvirus diferentes a los mencionados para el control negativo.

Una vez ajustados los parámetros de amplificación, es necesario estudiar la sensibilidad y especificidad de los marcadores con muestras obtenidas mediante diferentes métodos de extracción de ADN. Esto permitiría protocolizar un procedimiento efectivo para la detección y diferenciación de VHS-1 y VHS-2 en futuros trabajos de investigación con estos dos virus.

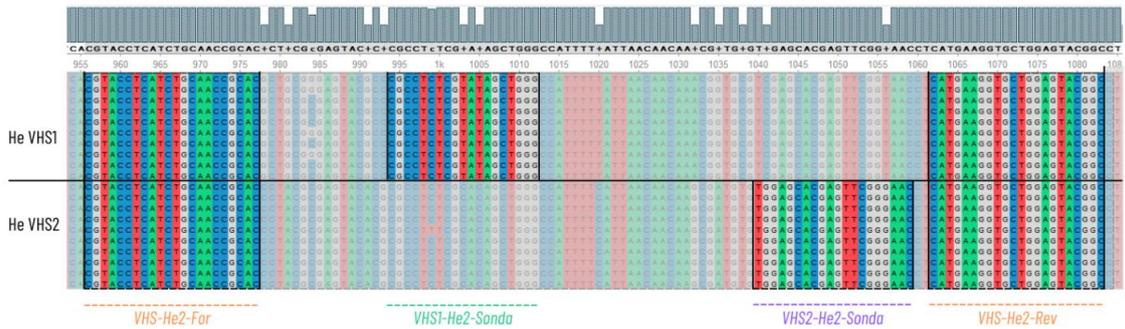
### Propuesta 1 - Gen: Glicoproteína B



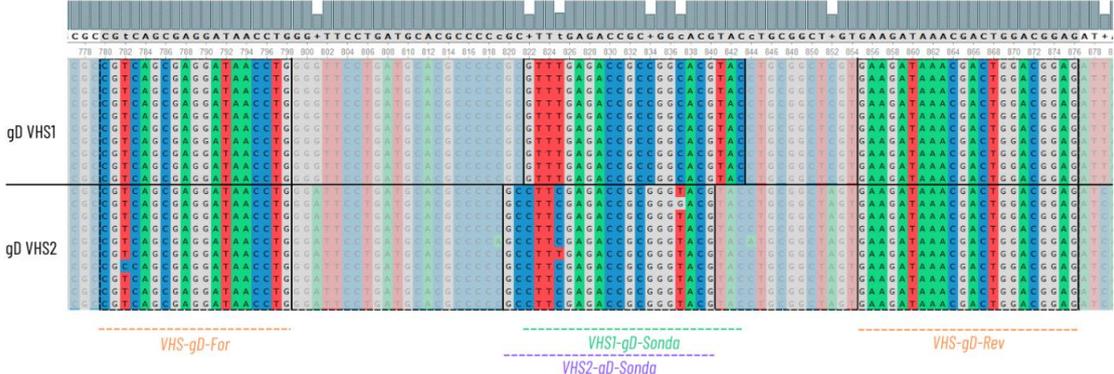
### Propuesta 2 - Gen: Helicasa



### Propuesta 3 - Gen: Helicasa



### Propuesta 4 - Gen: Glicoproteína D



**Figura 8.** Secuencias de los genes diana donde se localizan los marcadores moleculares propuestos. GenBank accession number para gB VHS1: K01760.1, EF177453.1, K03541.1, AF097023.1, AF311740.1, AF259899.1, U49121.1, JQ320080.1, AB252863.1, KY274369.1; para gB VHS2: M24771.1, EU018120.1, U12175.1, AY630441.1, KY007707.1, KY274391.1, KF588417.1, HM011366.1, AB442016.1, KP143740.1; para He VHS1: KM816932.1, MK878616.1, LC613247.1, KT899744.1, MN136523.1, KX946970.1, JX142173.1, GU734772.1, MN401208.1, MN159381.1; para He VHS2: KM816964.1, LC613250.1, MK855052.1, KF781518.1, MH790638.1, LS480640.1, KX574906.2, MF510267.1, KU310668.1, KP334097.1; para gD VHS1: L09243.1, EF177451.1, AF487902.1, AF333383.1, JQ320083.1, AY155225.1, AF293614.1, X54361.1, KY223561.1, L09244.1; para gD VHS2: K01408.1, AF021342.1, EU018125.1, EU445527.1, KF588429.1, AY517492.1, EU029158.1, KY223605.1, K02373.1, KT899744.1.

**Tabla 7. Condiciones de amplificación propuestas para la detección de VHS-1 y VHS-2 por qPCR con los marcadores moleculares diseñados en este trabajo.**

Cebador/sonda	Fase de reacción	Tiempo y Temperatura <sup>1</sup>	Número de ciclos
Propuesta 1 Gen: Glicoproteína B	Activación	5 min a 95°C	1
	Amplificación	15 s a 94°C 30 s a 60°C	40
Propuesta 2 Gen: Helicasa	Activación	5 min a 95°C	1
	Amplificación	15 s a 94°C 30 s a 60°C	40
Propuesta 3 Gen: Helicasa	Activación	5 min a 95°C	1
	Amplificación	15 s a 94°C 30 s a 62°C	40
Propuesta 4 Gen: Glicoproteína D	Activación	5 min a 95°C	1
	Amplificación	15 s a 94°C 30 s a 65°C	40

<sup>1</sup>Los tiempos y temperaturas indicados para las condiciones de amplificación estarán sujetos a modificaciones. Estos parámetros dependerán de los resultados obtenidos en la evaluación de la sensibilidad y especificidad de la reacción. Así mismo, también pueden verse influenciados por el termociclador y los reactivos (kit de ADN-Polimerasa) empleados durante la amplificación.

## 6. Conclusiones

---

1. Existe un evidente cambio en la epidemiología del VHS-1 y VHS-2, hasta ahora causante del herpes labial y genital, respectivamente. Este acontecimiento plantea la necesidad de contar con técnicas de detección e identificación rápidas, sensibles y específicas para ambos virus.
2. Los métodos moleculares han ido desplazando a las técnicas tradicionales de detección utilizadas para el diagnóstico de VHS. La qPCR destaca por su rapidez, elevada sensibilidad y especificidad, y por ser menos dependiente de las condiciones de recogida y transporte de la muestra.
3. El uso de kits comerciales empleados para la detección de VHS, y los equipos específicos asociado a estos reactivos, plantean una clara limitación en trabajos de investigación donde se requiera analizar un número elevado de muestras ya que encarecen el procedimiento.

4. Se han propuesto cuatro sets, de cebadores y sondas, que cumplen con los parámetros establecidos para el diseño de marcadores moleculares destinados a la amplificación diferencial por qPCR de secuencias específicas de los genes gB, gD y helicasa de VHS-1 y VHS-2.

5. Serán necesarias evaluaciones adicionales para ajustar los parámetros de amplificación a partir de las condiciones inicialmente propuestas en esta memoria con el fin de determinar la sensibilidad y especificidad de los marcadores moleculares para la detección de VHS-1 y VHS-2. Así mismo, se deberá evaluar un método de extracción de ADN adecuado para establecer un protocolo fiable de detección de estos virus mediante el uso de los marcadores propuestos.

## 7. Bibliografía

---

- [1] Davison A. J. et al. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154(1), 171-177. DOI: 10.1007/s00705-008-0278-4
- [2] Bascones-Martínez A, Pousa-Castro X. (2011). Herpesvirus. *Av. Odontoestomatol*, 27(1), 11-24.
- [3] Mattera A., y Barrios P. (2006). Herpesvirus. Schelotto, F. (ed.). *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (535 – 566). Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro. Fundación de Ediciones de la Facultad de Medicina de la UDELAR.
- [4] Liu F., y Zhou ZH. (2011). Comparative viron structure of human herpesviruses. Arvin A., et al. (eds.). *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Capítulo 3). Cambridge, Inglaterra: University of Cambridge Press.
- [5] Parra-Sánchez M. (2018). Úlceras genitales por virus herpes simplex. *Enfermedades Infecciones Microbiología Clínica*, 37(4), 260-264.
- [6] Davison A. J. (2011). Comparative analysis of the genomes. Arvin A., et al (eds.). *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Capítulo 2). Cambridge, Inglaterra: University of Cambridge Press.
- [7] Murray P. R. et al. (2021). Virus del herpes humano. Murray, P. R. et al (eds). *Microbiología médica*. 9º edición (Capítulo 43). Barcelona, España: Elsevier.
- [8] Mocarski Jr. E.S. (2011). Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. Arvin A., et al (eds.). *Human Herpesvirus: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (Capítulo 4). Cambridge, Inglaterra: University of Cambridge Press.
- [9] Hulo C., Masson P., y Castro E. Herpes simplex 1 genome organization. *ViralZone*. Recuperado de <https://viralzone.expasy.org/5756>

- [10] Schiffer T., y Corey L. (2020). Virus del Herpes Simplex. John E. Bennett J. E., Dolin R., y Blaser M. J. (eds.). Enfermedades infecciosas. Principios y prácticas. 9ª edición. (Capítulo 135). Barcelona, España: Elsevier.
- [11] Muñoz Hiraldo E., Morillo Gutiérrez B. (2017). Infecciones por Virus Herpes Simple. *Grupo de Patología Infecciosa de AEPap*. Recuperado de [https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/infecciones\\_por\\_virus\\_herpes\\_simple\\_.pdf](https://www.aepap.org/sites/default/files/documento/archivos-adjuntos/infecciones_por_virus_herpes_simple_.pdf)
- [12] Curbelo M. (2012). Caracterización clínico-epidemiológica de pacientes con herpes simple en Cienfuegos. *Medisur*, 10(4).
- [13] Retamal-Díaz A., Suazo P., Garrido I., Kalergis M. A., y González A. P. (2015). Evasión de la respuesta inmune por virus herpes simplex. *Revista chilena de infectología*, 32(1), 58-70. DOI: 10.4067/S0716-10182015000200009
- [14] Pires de Mello C.P. et al. (2018). Herpes simplex virus type 1: replication, latency, reactivation, and its antiviral targets. *Antiviral therapy*, 21(4), 277–286. DOI: 10.3851/IMP3018.
- [15] Taberner R. (2020) Herpes simple tipo 2: ¿en peligro de extinción? *Actas Dermosifiliográficas*; 111:2.
- [16] Magdaleno-Tapial J. et al. (2019). Infecciones genitales por virus herpes tipo 1 y virus herpes tipo 2 en Valencia, España: estudio observacional retrospectivo. *Actas Dermosifiliográficas*; 111:53-58.
- [17] Daoud Z., Ramos Amador JT Morillo Gutiérrez B., Muñoz Hiraldo E. (2018). Infecciones por virus Herpes simplex 1 y 2. *Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico*. Recuperado de <https://www.guia-abe.es/temas-clinicos-infecciones-por-virus-del-herpes-simple-1-y-2>
- [18] Organización Mundial de la Salud (2020). *Virus del herpes simple*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
- [19] Organización Mundial de la Salud (2019). *Infecciones de transmisión sexual*. Recuperado de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- [20] LeGoff J., Péré H., & Bélec L. (2014). Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virology Journal*, 11(1), 83. DOI: 10.1186/1743-422X-11-83
- [21] Whitley R., y Baines J. (2018). Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. *F1000Research*, 7 (F1000 Faculty Rev):1726. DOI: 10.12688/f1000research.16157.1
- [22] Muller W. J., & Zheng X. (2019). Laboratory diagnosis of neonatal herpes simplex virus infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(5). DOI:10.1128/JCM.01460-18.

- [23] Navarro D. et al. (2005). Actualización en el diagnóstico del Herpes Genital. *Control Calidad SEIMC*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/viomicromol/Herpesgen.pdf>
- [24] EraGen Biosciences, Inc. (2020). *MultiCode®-RTx Herpes Simplex Virus 1 & 2 Kit*. Recuperado de [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/K100336.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/K100336.pdf)
- [25] BD. *ProbeTec™ Herpes Simplex Viruses (HSV 1 & 2) Qx Amplified DNA Assays*. Recuperado de [https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8086121\(01\).pdf](https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8086121(01).pdf)
- [26] Luminex Corporation (2014). MultiCode®-RTx assay technology. Recuperado de <https://www.luminexcorp.com/multicode-technology/>
- [27] Thornton B., y Basu C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(2), 145–154. DOI: 10.1002/bmb.20461.
- [28] Marilyn R., Fairfax M. D., y Salimnia H. (2010). Quantitative PCR: An introduction. Grody W. W., Nakamura R., Kiechle F., y Strom Ch. (eds). *Molecular diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory* (Capítulo 1). Detroit, Estados Unidos: Academic Press.
- [29] Frequently asked questions, IDT. What secondary structure considerations need to be included when designing primers for PCR? Recuperado de <https://eu.idtdna.com/pages/support/faqs/what-secondary-structure-considerations-need-to-be-included-when-designing-primers-for-pcr->
- [30] Marcadores moleculares y genotipado. Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE). Recuperado de <https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/scsie-burjassot-paterna/genomica/servicios/marcadores-moleculares-genotipado-1285889341376.html>
- [31] Frequently asked questions, IDT. What secondary structure considerations need to be included when designing primers for PCR? Recuperado de <https://eu.idtdna.com/pages/support/faqs/what-secondary-structure-considerations-need-to-be-included-when-designing-primers-for-pcr->