

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 177**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/US2014/070915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14872357 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3084436**

54 Título: **Un ensayo serológico rápido y sensible para determinar si los pacientes están infectados por el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y/o de tipo 2 (VHS-2)**

30 Prioridad:

**18.12.2013 US 201361917584 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.04.2019**

73 Titular/es:

**BOARD OF TRUSTEES, SOUTHERN ILLINOIS  
UNIVERSITY (100.0%)  
801 N. Rutledge St. PO Box 19616  
Springfield, IL 62794-9616, US**

72 Inventor/es:

**HALFORD, WILLIAM P.**

74 Agente/Representante:

**PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén**

**ES 2 711 177 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Un ensayo serológico rápido y sensible para determinar si los pacientes están infectados por el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y/o de tipo 2 (VHS-2)

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Cincuenta millones de estadounidenses están infectados por el virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2), pero un 80-90 % de los infectados desconocen que son portadores del VHS-2 [CDC, 2010; Paz-Bailey *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006]. Independientemente de si los pacientes tienen síntomas visibles o no, pueden excretar el virus infeccioso y transmitir el VHS-2 a sus parejas sexuales [Rattray *et al.*, 1978; Tronstein *et al.*, 2011; Wald *et al.*, 2000]. Los fármacos antivíricos reducen, pero no eliminan, el riesgo de transmisión del VHS-2 [Sperling *et al.*, 2008; Handsfield *et al.*, 2007; Corey *et al.*, 2004; DeJesus *et al.*, 2003]. Los pacientes que saben que portan el VHS-2 pueden tomar medidas proactivas para reducir el riesgo de transmisión, incluyendo fármacos antivíricos, preservativos, divulgación a parejas y conocimiento de los síntomas sutiles, todos los cuales son herramientas eficaces para la reducción de la transmisión [Gupta *et al.*, 2007; Rana *et al.*, 2006; Warren, 2002; Wald *et al.*, 2001].

10 Las pruebas serológicas utilizadas para confirmar un diagnóstico de infección por el VHS-2 son imperfectas. Los problemas más importantes incluyen (1) el ensayo serológico ELISA específico para el tipo de VHS HerpeSelect® (Focus Diagnostics, una filial participada al 100 % por Quest Diagnostics, Inc.) puede devolver resultados falsos positivos y (2) la prueba de confirmación por inmunoelectrotransferencia del VHS (es decir, la referencia de las pruebas serológicas del VHS [Warren *et al.*, 2011]) puede devolver resultados "indeterminados".

15 Los pacientes con posibilidad de falsos positivos en el ELISA para el VHS-2 a menudo se clasifican como "positivos bajos" con un valor inicial de 1,1 a 3.5; un 50 % de estos pacientes demostraron ser falsos positivos en el ensayo de confirmación del VHS por inmunoelectrotransferencia. Sin embargo, la prueba de confirmación por inmunoelectrotransferencia no logra resolver el estado serológico de aproximadamente un 50 % de los pacientes que obtuvieron resultados "positivos bajos" para el VHS-2 en la prueba ELISA HerpeSelect®. Más bien, la prueba por inmunoelectrotransferencia típicamente devuelve resultados indeterminados para estos pacientes. Por tanto, las pruebas serológicas actuales del VHS-2 dejan un 2-4 % de pacientes con resultados ambiguos [Ng'ayo *et al.*, 2011; Golden *et al.*, 2005], que para los propósitos de este documento se denominan diagnóstico "indeterminado del VHS-2".

20 Tener un diagnóstico indeterminado deja a los pacientes preguntándose si están infectados por el VHS-2 y causa una angustia innecesaria en los pacientes que no están infectados [Warren, 2002; Warren y Ebel, 2005]. Los pacientes con un diagnóstico indeterminado se ven obligados a lidiar con las ramificaciones de una infección por el VHS-2 auténtica; específicamente, se sienten obligados a divulgar su "estado del VHS-2" a potenciales parejas sexuales, arriesgándose un posible rechazo; pueden tomar tratamiento antivírico diario para reducir el riesgo de infectar a otros; y creen que son tres veces más propensos a contraer la infección por el VIH que alguien que no tiene el VHS-2 [Vergidis *et al.*, 2009; Lingappa y Celum, 2007]. Repetir las pruebas a menudo no resuelve su diagnóstico y, por tanto, los pacientes pueden desconocer su estado de infección por el VHS-2 durante meses o años; esto puede tener un impacto profundamente negativo en la autopercepción de los pacientes y en su calidad de vida.

25 Por tanto, existe una necesidad no cubierta de un ensayo serológico mejorado para el diagnóstico de la infección por el VHS-2 que minimice, o elimine, los diagnósticos indeterminados del VHS-2. La presente invención es un novedoso ensayo serológico basado en citometría de flujo que mide la afinidad de unión de un anticuerpo en suero a células infectadas por el virus (*antibody-binding to virus-infected cells*, ABVIC) y se cree que es una prueba serológica para el VHS-2 más certera.

30 El documento US 5.965.354 divulga procedimientos y kits de prueba de inmunodiagnóstico para diagnosticar la infección por el virus del herpes simple (VHS) que emplean antígenos tanto específicos para el tipo específico como comunes contra todos los tipos.

35 El documento US 2011/0059553 divulga procedimientos para la detección de anticuerpos contra el VHS-2 por disminución de anticuerpos con reactividad cruzada (no específicos) en una muestra biológica.

40 Eing *et al* 2002 J Clin Microbiology 40:407-413 analizan estrategias para la detección de anticuerpos específicos para el tipo contra el virus del herpes simple de tipo 2.

45 Ashley *et al* 1988 J Clin Microbiology 26:662-667 analizan procedimientos para detectar anticuerpos contra el virus de herpes simple de tipos 1 y 2 en sueros humanos.

50 Sherlock *et al* 1986 J Clin Microbiology 24:1093-1097 analizan la especificidad por el tipo del anticuerpo fijador del complemento contra el antígeno temprano del virus de herpes simple de tipo 2 AG-4 en pacientes con infección asintomática.

Bernstein *et al* 1984 American Journal of Medicine 77:1055-1060 analizan el análisis serológico de la infección por el virus del herpes simple genital no primario del primer episodio.

Halford *et al* 2013 PLOS One 8: e65523 divulga que el anticuerpo IgG Pan-VHS-2 en ratones y cobayas vacunados se correlaciona con la protección frente al virus del herpes simple 2.

- 5 El documento WO 2005/098051 analiza péptidos que se derivan de la glucoproteína G2 del VHS-2 y representa epítomos específicos por el tipo del VHS-2.

Jani *et al* 2002 Lancet Infectious Diseases 2:243-250 analizan inmunoensayos multiplexados por citometría de flujo para el diagnóstico y la vigilancia de enfermedades infecciosas en entornos de escasos recursos.

#### BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

- 10 La invención es como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un ensayo serológico para determinar si un sujeto está infectado por el uno o el otro o ninguno de los virus del herpes simple 1 o 2. En términos generales, el ensayo comprende las etapas de proporcionar una muestra de suero o plasma que contenga anticuerpos (conjuntamente, "suero") del sujeto que se va a analizar. La muestra de suero contiene anticuerpos que se unen a antígenos celulares presentes en las células infectadas por el VHS-1 (VHS-1<sup>+</sup>), o células infectadas por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>), o células infectadas tanto por el VHS-1 como por el VHS-2, o células no infectadas ni por el VHS-1 ni por el VHS-2.

- La muestra de suero se puede dividir en al menos tres partes de submuestra. Se pone en contacto una parte de la submuestra de suero separada y se mantiene el contacto (se incuba) con uno de: (a) antígenos de células no infectadas por el VHS-1 ni el VHS-2 (VHS-1<sup>-</sup> y VHS-2<sup>-</sup>), (b) antígenos de células infectadas por el VHS-1 y (c) antígenos de células infectadas por el VHS-2, uniendo de este modo los anticuerpos presentes en cada submuestra con uno o más de los antígenos celulares citados. Cada una de dichas partes de la submuestra incubadas se separa de los antígenos unidos al anticuerpo para formar al menos tres muestras de suero preadsorbido. Por ejemplo, en la que (a) la submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos celulares no infectados contiene una cantidad reducida de anticuerpos que se unen a células no infectadas, (b) la submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos de células infectadas por el VHS-1 contiene una cantidad reducida de los anticuerpos que se unen a las células infectadas por el VHS-1 cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada, y (c) la submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos de células infectadas por el VHS-2 contiene una cantidad reducida de anticuerpos que se unen a las células infectadas por el VHS-2 cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada. Cada una de las partes de submuestra preadsorbidas se mezcla e incuba con una mezcla que comprende tres poblaciones celulares fijadas en las que la mezcla incluye células fijadas no infectadas por el VHS-1 ni por el VHS-2, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2, en las que las poblaciones celulares fijadas se distinguen entre sí por emisiones de fluorescencia cuando se irradian, de modo que el ensayo puede determinar por citometría de flujo a cual de una o más de las poblaciones celulares fijadas se unen los anticuerpos presentes en cada una de las submuestras, y, de este modo si el sujeto estaba infectado por el VHS-1, el VHS-2, los dos o ninguno.

- También se divulga un ensayo que comprende las etapas de proporcionar una muestra de suero o plasma (conjuntamente, "suero") del sujeto que se va a analizar, dividir la muestra de suero en al menos tres submuestras de suero, preadsorber las submuestras de suero a al menos tres poblaciones de antígenos, por ejemplo en forma de células fijadas, incubar las submuestras de suero con al menos tres poblaciones de células libres, incubar las submuestras de suero con un anticuerpo de detección y analizar las submuestras de suero con un dispositivo de separación celular o un citómetro de flujo.

- También se contempla un kit de ensayo serológico para determinar si un sujeto está infectado por uno, los dos o ninguno de los virus del herpes simple 1 y 2. El kit comprende a) tres recipientes separados para la preadsorción en suero que comprenden uno de (i) antígenos de células no infectadas en una matriz física, (ii) antígenos de células infectadas por el VHS-1 en una matriz física, o (iii) antígenos de células infectadas por el VHS-2 en una matriz física. Se incluye un cuarto recipiente en el kit, que comprende una mezcla de tres poblaciones de células fijadas, en el que la mezcla incluye células no infectadas, células infectadas por el VHS-1 y células infectadas por el VHS-2 que se han (1) fijado y se pueden distinguir entre sí por emisión de fluorescencia cuando se irradian. En una divulgación, las células fijadas se permeabilizan y (2) se marcan de forma diferencial con un fluoróforo de modo que un dispositivo de separación celular o citómetro

- de flujo puede diferenciar cada una de las tres poblaciones. En un modo de realización, el suero preadsorbido separado de las matrices que contienen antígeno proporcionadas en los recipientes 1, 2 y 3 del kit se separa de cada matriz y se combina con las células problema proporcionadas en el recipiente 4 del kit para determinar la abundancia relativa de anticuerpo específico contra el VHS-1 y/o el VHS-2 en un dispositivo de separación celular o citómetro de flujo. Cada uno de esos cuatro recipientes puede contener una cantidad suficiente del ingrediente citado para llevar a cabo al menos un ensayo. Las instrucciones para llevar a cabo un ensayo también pueden estar presentes en el kit.

El kit de ensayo serológico descrito anteriormente puede incluir además un quinto recipiente que contiene anticuerpos contra las globulinas humanas marcados, por ejemplo, en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo. El marcador de los anticuerpos contra las globulinas humanas puede ser un material fluorescente cuya fluorescencia es distinguible de la fluorescencia de cualquier otro material presente. En una divulgación, la mezcla de células problema fijadas del cuarto recipiente incluye además un colorante fluorescente introducido de forma exógena por el cual las células que contienen antígenos no infectados, del VHS-1 o del VHS-2 se pueden distinguir entre sí por fluorescencia, y también se pueden distinguir de cualquier otra especie fluorescente utilizada en el ensayo.

La presente invención tiene varios beneficios y ventajas.

Un beneficio es que muchos ensayos de anticuerpos son suficientes para distinguir las muestras seronegativas para el VHS de las seronegativas para el VHS, pero no diferencian si una persona está infectada por el VHS-1, el VHS-2 o los dos.

Una ventaja de la invención es que la parte de la invención del ensayo de anticuerpos específicos contra el VHS-1 diferencia si una persona está o no infectada por el VHS-1 y corrobora los resultados de la inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes.

Otro beneficio de la invención es que la parte del ensayo de anticuerpos específicos contra el VHS-2 diferencia si una persona está o no infectada por el VHS-2 y corrobora los resultados de la inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes.

Otra ventaja de la invención es que el ensayo ABVIC específico para el tipo combina (i) un ensayo de control no infectado, (ii) un ensayo de anticuerpo específico para el VHS-1 y (iii) un ensayo de anticuerpo específico para el VHS-2.

Otro beneficio de la invención es que el ensayo ABVIC específico para el tipo es altamente cuantitativo y permite la interpretación estadística de la probabilidad de que una persona sea seropositiva para el VHS-1 y/o el VHS-2.

Otra ventaja es que la potencia cuantitativa y estadística de un ensayo ABVIC específico para el tipo permite que el ensayo resuelva los resultados de pruebas indeterminados de las pruebas de inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes.

Un beneficio adicional de la invención es que el aumento de la sensibilidad y potencia cuantitativa del ensayo ABVIC específico para el tipo con respecto a la inmunoelectrotransferencia para el virus de herpes puede permitir que un ensayo ABVIC específico para el tipo se lleve a cabo más rápidamente que el ensayo con formato de inmunoelectrotransferencia habitual, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de distinguir la infección por el VHS-1 de la infección por el VHS-2.

Una ventaja adicional de la invención es que puede proporcionar resultados más sensibles que el ensayo comercial ELISA prueba HerpeSelect® porque un ensayo ABVIC específico para el tipo detecta la presencia de anticuerpos contra hasta 75 proteínas del VHS-1 o del VHS-2 que pueden estar presentes en las células problema fijadas y permeabilizadas descritas anteriormente. En cambio, el ELISA HerpeSelect® somete a prueba anticuerpos contra solo 1 de 75 proteínas del VHS-1 o el VHS-2; a saber, la glicoproteína G.

Todavía otros beneficios y ventajas serán evidentes para el experto a partir de la descripción que sigue.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra una medición basada en citometría de flujo de las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2. Las FIG. 1A y 1B muestran el marcado inmunofluorescente de placas del VHS-2 fijadas con una dilución 1:6000 de (A) suero de ratón no sometido previamente a experimentación o (B) suero con anticuerpos contra el VHS-2 obtenido de ratones inmunizados con

VHS-2 0ΔNLS [Halford *et al.*, 2010]. La unión de IgG de ratón se visualizó con anticuerpos de cabra contra IgG de ratón marcados con AlexaFluor594 (H+L). Las FIG. 1C y 1D muestran el análisis de citometría de flujo de dos colores de una suspensión de células sueltas fijadas de células Vero infectadas por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>) marcadas con CFSE mezcladas con células Vero no infectadas (NI). Las células fijadas se incubaron con una dilución 1:6000 de (C) suero de ratón no sometido previamente a experimentación o (D) suero con anticuerpos contra el VHS-2 de ratón y anticuerpos de cabra contra IgG de ratón marcados con APC, y se analizaron para determinar la intensidad fluorescente de CFSE (FL1) y APC (FL4). La FIG. 1E muestra concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en el suero de  $n = 6$  ratones no sometidos previamente a experimentación frente a  $n = 6$  ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS, según lo determinado por la ΔMFI entre el VHS-2<sup>+</sup> y células NI.

La FIG. 2 muestra que las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 se correlacionan con la protección frente a la prueba de provocación ocular con el VHS-2 en ratones. La FIG. 2A muestra el diseño del experimento de vacunación y provocación ocular con el VHS-2 en ratones. Se inoculó inicialmente en ratones, en su ojo derecho, el

día 0 medio de cultivo o  $10^5$  unidades formadoras de placa (UFP) por ojo de uno de los cinco virus indicados ( $n = 8$  por grupo). Se trató con aciclovir a los ratones en los que se inoculó VHS-2 MS desde los días 0 a 20 posteriores a la inmunización para restringir la patogenia vírica. El día 60, se recogió sangre y, el día 70, se realizó la prueba de provocación en el ojo izquierdo de los ratones con  $10^5$  UFP de VHS-2 MS natural. La **FIG. 2B** muestra la media  $\pm$  EEM de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en suero antes de la prueba de provocación, según lo determinado por un ensayo basado en citometría de flujo. La **FIG. 2C** muestra para cada ratón (un símbolo por ratón) la cantidad promedio de VHS-2 infeccioso excretado en los días 1, 2 y 3 después de la provocación ocular (eje de ordenadas) representada gráficamente como una función de las concentraciones de IgG del VHS-2 antes de la provocación observadas en el mismo ratón (eje de abscisas). La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con el mejor ajuste,  $y = 3,35 - 0,56x$ , para los 48 pares de datos emparejados. La **FIG. 2D** muestra la media  $\pm$  EEM del log (IgG de pan-VHS-2) en cada grupo de inmunización representada gráficamente en el eje de abscisas frente a la media  $\pm$  EEM frente a la excreción ocular de VHS-2 en el eje de ordenadas. La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con mejor ajuste,  $y = 3,44 - 0,64x$ , para estos 6 promedios emparejados ( $r^2 = 0,86$ ). Los grupos de ratones inmunizados que presentaron una reducción significativa de la excreción ocular de VHS-2 con respecto a los ratones no sometidos previamente a experimentación se indican mediante un asterisco único ( $*p < 0,05$ ) o un doble asterisco ( $**p < 0,001$ ), según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori*. La **FIG. 2E** muestra la frecuencia de supervivencia en cada grupo representada gráficamente como una función de la media  $\pm$  EEM de la concentración de anticuerpos IgG contra pan-VSH-2 observada en cada grupo. Los grupos de ratones inmunizados que presentaron una diferencia significativa en frecuencia de supervivencia con respecto a los ratones no sometidos previamente a experimentación se indican mediante un asterisco único ( $*p < 0,05$ ) o un doble asterisco ( $**p < 0,0001$ ), según lo determinado por una prueba exacta de Fisher.

La **FIG. 3** muestra que las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 se correlacionan con la protección frente a la prueba de provocación vaginal con el VHS-2 en ratones. La **FIG. 3A** muestra el diseño del experimento con vacuna-provocación en ratones. Se inmunizaron ratones en las almohadillas de la pata trasera derecha el día 0 con gD-2, GFP, medio de cultivo (simulado), VHS-2 0 $\Delta$ NLS o VHS-2 MS, como se describe en los resultados ( $n = 10$  por grupo). Los ratones inmunizados con VHS-2 MS recibieron 1 mg/ml de aciclovir en agua potable desde los días 0 a 20 posteriores a la inmunización para frenar la patogenia de una exposición primaria al VHS-2 natural. Todos los ratones recibieron una dosis de refuerzo en las almohadillas de la pata trasera izquierda el día 30 con una inmunización de refuerzo equivalente, con la excepción de que los ratones inmunizados con la cepa MS no necesitaron aciclovir durante el refuerzo. El día 60, se recogió sangre y, los días 90 o 100, se realizaron pruebas de provocación en ratones con 500 000 UFP por vagina de VHS-2 natural. Siete y 3 días antes de la prueba de provocación con VHS-2 MS, cada ratón recibió una inyección subcutánea de 2 mg de DepoProvera® (medoxiprogesterona) para hacer que las vaginas de ratón fueran susceptibles a la provocación con VHS-2. La **FIG. 3B** muestra la media  $\pm$  EEM de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en suero antes de la prueba de provocación, según lo determinado por un ensayo basado en citometría de flujo. Se indica la frecuencia con la que los ratones sobrevivieron hasta el día 30 posterior a la prueba de provocación. La **FIG. 3C** muestra la cantidad promedio de VHS-2 infeccioso que se excretó en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la prueba de provocación vaginal para cada ratón (un símbolo por animal; eje de ordenadas) representada gráficamente como una función de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 anteriores a la prueba observadas en el mismo ratón (eje de abscisas). La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con el mejor ajuste,  $y = 3,85 - 0,76x$ , para los 50 pares de datos emparejados. La **FIG. 3D** muestra la media  $\pm$  EEM del log (IgG de pan-VHS-2) en cada grupo de inmunización representada gráficamente en el eje de abscisas frente a la media  $\pm$  EEM frente a la excreción vaginal de VHS-2 en el eje de ordenadas. La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con mejor ajuste,  $y = 3,89 - 0,79x$ , para estos 5 promedios emparejados ( $r^2 = 0,98$ ). Los grupos de ratones inmunizados que presentaron una reducción significativa de la excreción vaginal de VHS-2 con respecto a los ratones no sometidos previamente a experimentación se indican mediante un asterisco único ( $*p < 0,05$ ) o un doble asterisco ( $**p < 0,001$ ), según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori*.

La **FIG. 4** muestra que las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 se correlacionan con la protección frente a la prueba de provocación vaginal con el VHS-2 en cobayas. La **FIG. 4A** muestra el diseño del experimento con vacuna-provocación en cobayas. Se inmunizaron cobayas en las almohadillas de la pata trasera derecha el día 0 con gD-2, medio de cultivo (simulado), VHS-2 0 $\Delta$ NLS o VHS-2 MS ( $n = 5$  por grupo). Las cobayas inmunizadas con VHS-2 MS recibieron 1 mg/ml de aciclovir en agua potable desde los días 0 a 20 posteriores a la inmunización para frenar la patogenia de una exposición primaria al VHS-2 natural. Todas las cobayas recibieron una dosis de refuerzo en las almohadillas de la pata trasera izquierda el día 30 con una inmunización de refuerzo equivalente. Las cobayas inmunizadas con la cepa MS no recibieron aciclovir durante el refuerzo secundario. El día 75, se recogió sangre y, el día 90, se realizaron pruebas de provocación en cobayas con  $2 \times 10^6$  UFP por vagina de VHS-2 natural. La **FIG. 4B** muestra la media  $\pm$  EEM de UFP de VHS-2 excretado por vagina entre los días 1 y 8 posteriores a la prueba de provocación en cobayas no habían sido sometidas previamente a experimentación ( $n = 5$ ) o a las que se había inmunizado con gD-2 + alumbre/MPL ( $n = 4$ ), VHS-2 0 $\Delta$ NLS ( $n = 5$ ) o infección por el VHS-2 MS restringida por aciclovir (ACV) ( $n = 5$ ). Un asterisco único (\*) denota  $p < 0,05$  y un doble asterisco (\*\*) denota  $p < 0,0001$  de que la excreción vaginal de VHS-2 MS sea equivalente para las cobayas no sometidas previamente a experimentación en ese día, según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori*. La **FIG. 4C** muestra para cada cobaya (un símbolo por animal) la cantidad promedio de VHS-2 infeccioso excretado en los días 1, 2, 3, 4,

6 y 8 después de la provocación vaginal (eje de ordenadas) representada gráficamente como una función de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la provocación observadas en la misma cobaya (eje de abscisas). La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con el mejor ajuste,  $y = 3,77 - 0,95x$ , para estos 19 pares de datos emparejados. La **FIG. 4D** muestra la media  $\pm$  EEM del log (IgG de pan-VHS-2) en cada grupo de inmunización representada gráficamente en el eje de abscisas frente a la media  $\pm$  EEM frente a la excreción vaginal de VHS-2 en el eje de ordenadas. La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con mejor ajuste,  $y = 3,77 - 0,95x$ , para estos cuatro promedios emparejados ( $r^2 = 0,98$ ). Los grupos de cobayas inmunizadas que presentaron una reducción significativa de la excreción vaginal de VHS-2 con respecto a los cobayas no sometidas previamente a experimentación se indican mediante un asterisco único ( $*p < 0,05$ ) o un doble asterisco ( $**p < 0,001$ ), según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori*. La **FIG. 4E** muestra el peor caso de enfermedad perivaginal en cada grupo de cobayas no sometidas previamente a experimentación o inmunizadas el día 7 después de la prueba de provocación. La frecuencia de supervivencia se refiere a la frecuencia con la que los animales en cada grupo de inmunización sobrevivieron hasta el día 30 después de la prueba de provocación.

La **FIG. 5** muestra que la transferencia adoptiva de suero con anticuerpos contra el VHS-2 proporciona una protección limitada frente a la provocación ocular con VHS-2 MS. Ratones hembra de la línea 129, emparejados por la edad, recibieron: 1) una transferencia adoptiva de 0,25 ml de suero no sometido previamente a experimentación antes de la prueba de provocación; 2) una transferencia adoptiva de 0,25 ml de suero con anticuerpos contra el VHS-2 justo antes de la prueba de provocación; o 3) inmunización activa con el virus vivo VHS-2  $\Delta$ NLS 90 y 60 días antes de la prueba de provocación. Se realizaron pruebas de provocación en ratones en ambos ojos con 100 000 UFP por ojo de VHS-2 MS y se registraron la excreción del virus de la provocación y la aparición de enfermedad. Las **FIG. 5A y 5B** muestran la media  $\pm$  EEM de la excreción de VHS-2 desde los ojos de los ratones (A) el día 1 y (B) el día 3 después de la prueba de provocación ( $n = 5$  por grupo). La **FIG. 5C** muestra la media  $\pm$  EEM de la duración de la supervivencia de cada grupo de ratones. Los números sobre cada barra informan de la frecuencia de "supervivencia" e "incidencia de enfermedad" en cada grupo de ratones. Los aumentos significativos de la duración de la supervivencia con respecto a los ratones no sometidos previamente a experimentación mediante un asterisco único ( $*p < 0,05$ ) o un doble asterisco ( $**p < 0,001$ ), según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori*.

La **FIG. 6** muestra una comparación de tres procedimientos utilizados para medir las concentraciones séricas de anticuerpos específicos contra el VHS-2. <sup>a</sup>Intervalo de diluciones de suero con anticuerpos contra el VHS-2 en el que las estimaciones de la abundancia de anticuerpos contra el VHS-2 cambiaron en relación lineal con los cambios en la dilución del suero. <sup>b</sup>Media  $\pm$  EEM del coeficiente de variación de mediciones por triplicado para cada dilución de suero en el intervalo lineal de cada ensayo. Para cada dilución de suero considerada, el coeficiente de variación =  $100 \times$  desviación estándar  $\div$  media. <sup>c</sup>Bondad de ajuste ( $r^2$ ) de los datos observados con respecto a los valores pronosticados por un modelo de regresión dentro del intervalo lineal. El valor  $p$  se refiere a la probabilidad de que la cantidad medida por cada ensayo (es decir, el título de anticuerpos neutralizantes,  $DO_{405}$  o  $\Delta$ MF1) no varíe como una función de la dilución de suero con anticuerpos contra el VHS-2.

La **FIG. 7** muestra que las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 se correlacionan con la protección frente a la prueba de provocación vaginal con el VHS-2 en ratones y cobayas. <sup>a</sup>Se inmunizaron animales con cada inmunógeno, como se describe en las FIG. 3A y 4A. <sup>b</sup>Los ratones no sometidos previamente a experimentación y los inmunizados corresponden a animales presentados en la FIG. 3. Las cobayas corresponden a animales presentados en la FIG. 4. <sup>c</sup>La media  $\pm$  EEM del log (IgG de pan-VHS-2) corresponde a las variables en el eje de abscisas en la FIG. 3C para ratones y corresponde a las variables en el eje de abscisas en la FIG. 4C para cobayas. <sup>d</sup>La media  $\pm$  EEM del log (reducción de la excreción de VHS-2 vaginal) se derivó de las variables en el eje de ordenadas presentadas en la FIG. 3C para ratones y se derivó de las variables en el eje de ordenadas presentadas en la FIG. 4C para cobayas. <sup>e</sup>Frecuencia de los animales que sobrevivieron hasta el día 30 después de la prueba de provocación con el VHS-2. <sup>f</sup>No determinado.  $*p < 0,05$ , según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori* que compara animales inmunizados frente a animales no sometidos previamente a experimentación de la misma especie.  $**p < 0,001$ , según lo determinado por ANOVA unilateral y una prueba de la  $t$  de Tukey *a posteriori* que compara animales inmunizados frente a animales no sometidos previamente a experimentación de la misma especie.  $\dagger p = 0,01$ , según lo determinado por la prueba exacta de Fisher que compara la frecuencia de supervivencia de animales inmunizados frente a animales no sometidos previamente a experimentación de la misma especie.  $\dagger\dagger p = 0,00001$ , según lo determinado por la prueba exacta de Fisher que compara la frecuencia de supervivencia de animales inmunizados frente a animales no sometidos previamente a experimentación de la misma especie.

La **FIG. 8** muestra una comparación de tres procedimientos para medir concentraciones de anticuerpos contra el VHS-2. La **FIG. 8A** muestra la actividad neutralizante de VHS-2 en una serie de dilución de 0,33 log de suero con anticuerpos contra el VHS-2 de ratón. Se informa del título de anticuerpos neutralizantes como la media  $\pm$  EEM de  $n = 3$  duplicados por dilución. La **FIG. 8B** muestra la medición basada en ELISA de captura de anticuerpos de las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 en una serie de dilución de 0,33 log de suero con anticuerpos contra el VHS-2 (media  $\pm$  EEM de  $n = 3$  duplicados por dilución). La **FIG. 8C** muestra la medición basada en citometría de flujo de las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 en una serie de dilución de 0,33 log

de suero con anticuerpos contra el VHS-2 (media  $\pm$  EEM de  $n = 3$  duplicados por dilución). Las líneas discontinuas representan el límite inferior de detección de cada ensayo.

La **FIG. 9** muestra la medición por ELISA de captura de anticuerpos frente a citometría de flujo de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en suero de ratón. La **FIG. 9A** muestra la curva estándar de ELISA de captura de anticuerpos. Los círculos abiertos indican el desarrollo colorimétrico ( $DO_{405}$ ) observado en los pocillos de ELISA que recibieron diluciones de 0,33 log de suero con anticuerpos contra el VHS-2 (media  $\pm$  SD;  $n = 4$  por dilución). La relación sigmoidea entre  $DO_{405}$  y log (IgG de pan-VHS-2) se describió con precisión utilizando la ecuación de tangente hiperbólica mostrada ( $r^2 = 1,00$ ), y se usó una ecuación de arcotangente hiperbólica recíproca (definida en Procedimientos) para derivar las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en muestras de suero de prueba partir de los valores de  $DO_{405}$  observados en ELISA. La **FIG. 9B** muestra para cada ratón (un símbolo por ratón) la cantidad promedio de VHS-2 infeccioso excretado en los días 1, 2 y 3 después de la provocación ocular (eje de ordenadas) representada gráficamente como una función de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la provocación, como se estima mediante ELISA (eje de abscisas). La línea negra continua representa el modelo de regresión lineal con el mejor ajuste,  $y = 3,05 - 0,57x$ , para los 48 pares de datos emparejados. La **FIG. 9C** muestra las estimaciones por ELISA frente a citometría de flujo de log (IgG de pan-VHS-2) representadas gráficamente como pares de datos de los ejes de abscisas y ordenadas con respecto a una "línea de equivalencia" de 0 log. Los puntos de datos más allá de la línea de referencia "+1 log" indican muestras de suero en las que las estimaciones por citometría de flujo de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 fueron 1 logaritmo mayor que la estimación por ELISA de IgG de pan-VHS-2 para la misma muestra de suero.

La **FIG. 10** muestra que el ensayo ABVIC de dos poblaciones celulares establece que dos de cuatro pacientes con "VHS-2 indeterminado" son seronegativos. Unión de anticuerpos IgG humanos a una suspensión fijada de células VHS-2<sup>+</sup> marcadas con CFSE y células Vero no infectadas (NI) teñidas con anticuerpos séricos. La **FIG. 10A** muestra un sujeto seronegativo. La **FIG. 10B** muestra un paciente con herpes genital por el VHS-2. La **FIG. 10C** muestra una muestra de suero indeterminada 1. La **FIG. 10D** muestra una muestra de suero indeterminada 3. La unión de IgG humana a las células problema (eje de ordenadas) se detectó con anticuerpos contra la cadena y humana conjugada con APC.

La **FIG. 11** muestra que la preadsorción sérica proporciona poblaciones enriquecidas de anticuerpos específicos para el tipo de VHS. El suero de un paciente seropositivo puede contener tres poblaciones de anticuerpos que son comunes contra todos los tipos de VHS, específicos para el VHS-1 o específicos para el VHS-2. La preadsorción sérica a células Vero NI no retira los anticuerpos contra el VHS (columna izquierda). La preadsorción a células VHS-1<sup>+</sup> aumenta los anticuerpos específicos contra el VHS-2 (columna central). La preadsorción a células VHS-2<sup>+</sup> aumenta los anticuerpos específicos contra el VHS-1 (columna derecha).

La **FIG. 12** muestra que el ensayo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares demuestra que dos de cuatro pacientes con "VHS-2 indeterminado" son seronegativos para el VHS-2 pero seropositivos para el VHS-1. Se muestra la unión del anticuerpo IgG humano a las células no infectadas (NI) frente a VHS-1<sup>+</sup> frente a VHS-2<sup>+</sup> marcadas con CFSE. La **FIG. 12A** muestra células teñidas con suero seronegativo. La **FIG. 12A** muestra células teñidas con suero seropositivo para el VHS-2. La **FIG. 12C** muestra células teñidas con una muestra de suero indeterminada 3. Se preadsorbieron muestras de suero de pacientes a células Vero NI (izquierda), células VHS-1<sup>+</sup> (centro) y células VHS-2<sup>+</sup> (derecha). Los recuadros en la columna central indican la posición teórica de las células VHS-2<sup>+</sup> si el suero contiene anticuerpos específicos contra el VHS-2. Los recuadros en la columna derecha indican la posición teórica de las células VHS-1<sup>+</sup> si el suero contiene anticuerpos específicos contra el VHS-1.

La **FIG. 13** muestra que los ELISA específicos de gG solo somete a prueba un 3-10 % de todos los anticuerpos específicos contra el VHS-2. La **FIG. 13A** es un diagrama de sectores que representa todos los posibles anticuerpos específicos contra el VHS en una persona infectada por el VHS-1 y/o el VHS-2. La **FIG. 13B** ilustra que los ELISA HerpeSelect® detectan anticuerpos específicos contra gG. La **FIG. 13C** ilustra que los anticuerpos específicos contra gG representan solo un 3-10 % del repertorio total de anticuerpos específicos contra el VHS-1 o el VHS-2 que se podrían usar para medir el estado serológico del VHS de un paciente. La **FIG. 14**, en tres paneles como **FIG. 14A**, **FIG. 14B**, y **FIG. 14C**, muestra que el CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) proporciona un marcador diferencial que permite a un citómetro de flujo distinguir fácilmente una (**FIG. 14A**) población pura de células no infectadas CFSE(-) de una (**FIG. 14B**) población pura de células VHS-1<sup>+</sup> CFSE(lo), de una población pura (**FIG. 14C**) de células VHS-2<sup>+</sup> CFSE(hi).

La **FIG. 15**, en cuatro paneles como **FIG. 15A**, **FIG. 15B**, **FIG. 15C** y **FIG. 15D**, establece las concentraciones de fondo del anticuerpo que se unen a las tres poblaciones de células problema de cuatro pacientes seronegativos para el VHS diferentes. Para el suero de cada paciente, hay tres gráficos de citometría de flujo y son de muestras de suero que fueron: (1) gráfico de la izquierda: preadsorbidas a una matriz de antígeno no infectado (NI), (2) gráfico del centro: preadsorbidas a una matriz de antígeno infectado por el VHS-1 (VHS-1<sup>+</sup>), y (3) gráfico de la derecha: preadsorbidas a una matriz de antígeno infectado por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>).

La **FIG. 16**, en cuatro paneles como **FIG. 16A**, **FIG. 16B**, **FIG. 16C** y **FIG. 16D**, es como se describe en la FIG. 15, excepto que las muestras de los pacientes son un paciente fuertemente VHS-1<sup>+</sup> (**FIG. 16A**), un paciente débilmente

VHS-2<sup>+</sup> (**FIG. 16B**), un paciente fuertemente VHS-2<sup>+</sup> (**FIG. 16C**) y un paciente fuertemente VHS-1<sup>+</sup> y VHS-2<sup>+</sup> (**FIG. 16D**).

La **FIG. 17**, en tres paneles como **FIG. 17A**, **FIG. 17B** y **FIG. 17C**, es como se describe en las **FIG. 15** y **16**, excepto que las muestras de pacientes son de tres pacientes indeterminados que fueron clasificados por la prueba de inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes como "indeterminados para el VHS-2". Ninguno de estos pacientes tiene el VHS-2.

La **FIG. 18**, en tres paneles como **FIG. 18A**, **FIG. 18B** y **FIG. 18C**, es como se describe en las **FIG. 15-17**, excepto que las muestras de pacientes son de tres pacientes que fueron clasificados por la prueba de inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes como "indeterminados para el VHS-2". Ninguno de estos pacientes tiene el VHS-2.

La **FIG. 19**, en tres paneles como **FIG. 19A**, **FIG. 19B** y **FIG. 19C**, es un resumen gráfico de los resultados de tres de los grupos de control, a saber  $n = 5$  pacientes seronegativos para el VHS (**FIG. 19A**),  $n = 2$  pacientes VHS-1<sup>+</sup> (**FIG. 19B**) y  $n = 2$  pacientes VHS-2<sup>+</sup> (**FIG. 19C**). Las flechas negras apuntando hacia abajo en cada **FIG.** muestran la altura esperada de las barras rojas (es decir, el anticuerpo unido a células VHS-2<sup>+</sup>) si el paciente estaba realmente infectado por el VHS-2. Estas condiciones se cumplen en pacientes VHS-2<sup>+</sup>, pero la prueba ABVIC específica para el tipo discrimina fácilmente a las personas que son (A) seronegativas o (B) VHS-1<sup>+</sup>. Es importante destacar que la línea discontinua indica el valor de corte para la significación estadística ( $p < 0,05$ ), y las barras que son positivas en estos gráficos representan diferencias altamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

La **FIG. 20**, en dos paneles como **FIG. 20A** y **FIG. 20B**, es un resumen gráfico de los resultados de dos "pacientes indeterminados" representativos según lo determinado por los resultados del ensayo ABVIC específico para el tipo mostrado en las **FIG. 17** y **18**. De  $n = 7$  pacientes indeterminados seleccionados en esta prueba,  $n = 3$  fueron seronegativos para el VHS como el paciente n.º 2 mostrado en la **FIG. 20A** y  $n = 4$  fueron seropositivos para el VHS-1 como el paciente n.º 6 mostrado en la **FIG. 20B**. Las flechas negras apuntando hacia abajo en cada panel muestran la altura esperada de las barras rojas (es decir, el anticuerpo unido a células VHS-2<sup>+</sup>) si el paciente estaba realmente infectado por el VHS-2. La línea discontinua indica el valor de corte para la significación estadística ( $p < 0,05$ ), por lo que los datos de la prueba indican que la probabilidad es muy baja de que estos individuos sean seropositivos para el VHS-2 (por ejemplo,  $p < 0,0001$ ).

La **FIG. 21**, en dos paneles como **FIG. 21A** y **FIG. 21B**, ilustra cómo los datos altamente cuantitativos proporcionados por un ensayo de la invención se pueden analizar estadísticamente para asignar probabilidades al riesgo de un paciente de ser VHS-2<sup>+</sup>. La **FIG. 21A** muestra una distribución normal del valor calculado del "Anticuerpo unido a células normalizado" e indica que con un valor de abscisa de aproximadamente 3,6 y superior, la probabilidad,  $p$ , es menor de 0,05 de que un paciente sea seronegativo para el VHS para la población particular de anticuerpos sometidos a pruebas (es decir, pruebas con preadsorción a NI para el total de anticuerpos contra el VHS; pruebas con preadsorción a VHS-1 para anticuerpos específicos contra el VHS-2 y pruebas con preadsorción a VHS-2 para anticuerpos específicos contra el VHS-1). La **FIG. 21B** muestra que debido a que el "Anticuerpo unido a células normalizado" se distribuye normalmente, se puede calcular la probabilidad de que una muestra dada esté  $X$  veces por encima del promedio de las muestras seronegativas, que, según las definiciones utilizadas para estos cálculos, siempre tienen un valor medio "anticuerpo unido a células normalizado" de 1,0. Según este gráfico y las matemáticas subyacentes, una muestra cuyo valor de "anticuerpo unido a células normalizado" = 5,0 solo tiene una probabilidad,  $p$ , = 0,005 de ser una muestra seronegativa que proporcionaba un valor más alto debido a la variación del muestreo aleatorio. El valor de corte  $p < 0,05$  se muestra como una línea discontinua.

La **FIG. 22**, en dos paneles como **FIG. 22A** y **FIG. 22B**, muestra cómo se pueden usar las concentraciones de "anticuerpo unido a células" de varias muestras de pacientes en una ecuación que describe la curva en forma de S en la **FIG. 21B** para retrocalcular la probabilidad,  $p$ , de que esta muestra sea una muestra seronegativa. La **FIG. 22A**, ilustra el suero que se preadsorbió a una matriz de antígeno de VHS-1 y, por lo tanto, debía contener anticuerpos específicos contra el VHS-2 si estaban presentes originalmente en la muestra del paciente. Ninguna de las 7 muestras "indeterminadas" analizadas fue significativamente diferente de la distribución normal de las muestras seronegativas para el VHS conocidas (es decir,  $p > 0,05$ ), mientras que todas las VHS-2<sup>+</sup> conocidas fueron muy significativas ( $p < 0,0001$ ). La **FIG. 22A** también ilustra que la preadsorción funciona bien, por lo que los sueros de pacientes VHS-1<sup>+</sup> son negativos para anticuerpos específicos contra el VHS-2 (igual que seronegativos) después de ser preadsorbidos a una matriz de antígeno de células de VHS-1. La **FIG. 22B** ilustra resultados análogos a los de la **FIG. 22A** cuando se representan gráficamente datos de anticuerpos específicos contra el VHS-2 en lugar de datos de anticuerpos específicos contra el VHS-1.

**FIG. 23**, en una serie de ocho partes en dos columnas verticales de cuatro micrografías inmunofluorescentes cada una. Se infectaron monocapas de células Vero con uno u otro de VHS-1 y VHS-2 para formar placas, o ninguno (no infectadas, NI). Antes de la adición del suero del paciente a estas células problema (es decir, placas de VHS-1 o VHS-2 en una monocapa de células fijadas y permeabilizadas), se preadsorbió el suero del paciente a una matriz de Sefarose® 4B activado por bromuro de cianógeno (CNBr) recubierto con los antígenos de células Vero no infectadas (NI), células Vero VHS-1<sup>+</sup> o células Vero VHS-2<sup>+</sup> para proporcionar una base para la preadsorción y retirada de anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y anticuerpos específicos contra el VHS-1 o el VHS-2. Las

micrografías de la parte superior muestran que el suero diluido, pero no preadsorbido, contenía una mezcla de anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y anticuerpos específicos contra el VHS-2 que se unían conjuntamente tanto a (i) placas de VHS-1 mostradas a la izquierda como a (ii) placas de VHS-2 mostradas a la derecha. Por consiguiente, el suero no adsorbido del paciente fue insuficiente para determinar si este sujeto estaba infectado por el VHS-1 y/o el VHS-2. La misma dilución del suero seguida de la preadsorción a una matriz de antígeno no infectado (NI) todavía contenía una mezcla de anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y anticuerpos específicos contra el VHS-2 que se unían conjuntamente tanto a (i) placas de VHS-1 mostradas a la izquierda como a (ii) placas de VHS-2 mostradas a la derecha de la segunda fila por abajo. Por consiguiente, el suero del paciente preadsorbido al antígeno de células NI fue insuficiente para determinar si este sujeto estaba infectado por el VHS-1 y/o el VHS-2. Después de la preadsorción del suero diluido con una matriz de antígenos infectados por el VHS-1 (VHS-1<sup>+</sup>) los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS disminuyeron, pero los anticuerpos específicos contra el VHS-2 se mantuvieron. Por consiguiente, la población enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-2 solo se unieron escasamente a las placas de VHS-1 de la izquierda (casi completamente oscuras), pero se unieron fuertemente a las placas de VHS-2 mostradas en la micrografía más brillante a la derecha de la tercera fila hacia por abajo. Por consiguiente, el suero del paciente preadsorbido a antígeno de células de VHS-1 fue suficiente para determinar que este sujeto era seropositivo para el VHS-2, que es un pronóstico de una infección subyacente por el VHS-2. Se preadsorbió suero diluido en una matriz de antígenos infectados por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>), se disminuyeron los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y los anticuerpos específicos contra el VHS-2. Si este paciente estuviera infectado por el VHS-1 y, por tanto, si este paciente fuera seropositivo para el VHS-1, permanecerían los anticuerpos específicos contra el VHS-1. Sin embargo, las dos micrografías de la parte inferior muestran que el suero preadsorbido a VHS-2 no poseía anticuerpos que se unieran a las placas de VHS-1 a la izquierda a un nivel más alto que las placas de VHS-2 mostradas a la derecha (permaneciendo ambas oscuras). Por consiguiente, este suero del paciente preadsorbido a antígeno de VHS-2 fue suficiente para determinar que este sujeto era seronegativo para el VHS-1. Se detectó unión a anticuerpos utilizando anticuerpo caprino contra IgG humanas conjugado con Alexa Fluor® (Life Technologies) 594, que produce el color rojo capturado en las fotomicrografías.

La FIG. 24 muestra una serie similar de micrografías fluorescentes a las de la FIG. 23 obtenidas utilizando los mismos reactivos, pero un suero diferente de un paciente conocido por ser tanto seropositivo para el VHS-1 como seropositivo para el VHS-2. Usando el mismo razonamiento ofrecido en la FIG. 23, los datos obtenidos con el suero preadsorbido a antígeno de VHS-1 del paciente muestran que el sujeto es seropositivo para el VHS-2 (tercera fila por abajo, la micrografía de la izquierda es oscura, mientras que la micrografía de la derecha es brillante). Del mismo modo, los datos obtenidos con el suero preadsorbido a antígeno de VHS-2 del paciente muestran que el sujeto es seropositivo para el VHS-1 (cuarta fila por abajo, la micrografía de la izquierda es brillante, mientras que la micrografía de la derecha es oscura).

### 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención es como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención contempla un ensayo que puede detectar y diferenciar entre infección por uno o los dos o ninguno del VHS-1 y el VHS-2 para los propósitos de diagnosticar una enfermedad a partir de una muestra de suero de un sujeto. Un modo de realización ilustrativo contempla un ensayo de tres poblaciones celulares que se denomina en el presente documento ensayo serológico basado en citometría de flujo que mide la afinidad específica del tipo de virus de la unión del anticuerpo a células infectadas por el virus (*antibody-binding to virus-infected cells*, ABVIC).

La presente invención contempla el uso de una muestra que contiene anticuerpos de un paciente cuyo estado de infección por el uno, el otro, los o ninguno del VHS-1 y el VHS-2 se debe determinar. Normalmente, esa muestra se encuentra en forma de suero o plasma procedente de una muestra de extracción de sangre. La muestra también puede ser una muestra enriquecida con anticuerpos, tal como un precipitado de sulfato de amonio de una muestra de sangre u otra muestra, como son bien conocidas, o proceder de una muestra de suero o plasma secada, por ejemplo, liofilizada. Por comodidad y debido a su similitud, el suero y el plasma se denominan conjuntamente suero en el presente documento.

50 La muestra del paciente (sujeto) se divide en al menos tres partes o submuestras. Cada parte (submuestra) se mezcla por separado y se pone en contacto con uno de (a) antígenos de células no infectadas por el VHS-1 y el VHS-2, (b) con antígenos de células infectadas por el VHS-1 y (c) con antígenos de células infectadas por el VHS-2.

55 Ese contacto se mantiene durante un período de tiempo suficiente para que los anticuerpos dentro de la submuestra que inmunorreaccionan con los antígenos citados inmunorreaccionen (se unan) con los mismos. Ese contacto y mantenimiento también se denomina una incubación en el presente documento. Los tiempos de mantenimiento pueden variar desde unos pocos minutos hasta aproximadamente 96 horas. Normalmente, el tiempo de mantenimiento es de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 horas, por ejemplo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6 horas.

Los antígenos celulares mencionados anteriormente forman parte en sí mismos de una matriz física, de modo que los anticuerpos sometidos a reacción forman anticuerpos unidos a la matriz física (también conocidos como anticuerpos unidos a matriz). Las matrices físicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, 1) una matriz sólida recubierta de proteína (por ejemplo, placa ELISA); 2) una matriz sólida recubierta de células (por ejemplo, placa de cultivo recubierta con células fijadas); 3) partículas flotantes (por ejemplo, células vivas o fijadas en suspensión líquida); 4) una columna de partículas (por ejemplo, células vivas o fijadas en un tubo capilar); 5) perlas magnéticas recubiertas de proteína; 6) una suspensión de matriz recubierta con proteína (por ejemplo, Sepharose® 4B activada con CNBr sometido a reacción con antígeno) suspendida en líquido, o empaquetada en una columna de flujo continuo.

Las suspensiones de células fijas y permeabilizadas no infectadas (NI), células VHS-1<sup>+</sup> y células VHS-2<sup>+</sup> se usaron de manera ilustrativa en el presente documento. Como es bien conocido en las técnicas biológicas, la fijación celular se puede lograr mediante una amplia variedad de productos químicos que incluyen, pero sin limitación, el tratamiento con uno o más de formaldehído, paraformaldehído, metanol, etanol y acetona. Las células utilizadas como cada una de las matrices físicas pueden ser del mismo tipo. Los tipos de células ilustrativas incluyen 1) células de neuroblastoma SK-N-SH humanas; 2) células de osteosarcoma U2OS humanas; 3) células de riñón embrionario 293 humanas; 4) células renales CV-1 de mono (células Vero); 5) células COS de mono; 6) células 3T3 de ratón; 7) células BHK-21 de hámster; 8) BIEC bovinas, 9) células BUVEC bovinas; 10) células Caco-2 humanas; 11) células HeLa humanas; 12) células MA104 de mono; 13) células MDCK caninas; 14) células PK-15 de cerdo; y 15) células WiDr humanas.

Cabe destacar que los virus con ICP0 de VHS forman placas con una eficiencia que no se puede distinguir de las células Vero en 11 de las otras 15 líneas celulares sometidas a prueba hasta la fecha. Específicamente, el trabajo realizado por el inventor y sus colaboradores indica que un 0,5-2 % de los virus con ICP0 de VHS forman placas en monocapas de células 293 humanas, células 3T3 de ratón, células BHK-21 de hámster, células BIEC bovinas, células BUVEC bovinas, células Caco-2 humanas, células HeLa humanas, células MA104 de mono, células MDCK caninas, células PK-15 de cerdo y células WiDr humanas. Por tanto, cualquier línea celular en esta lista, por definición, admite la replicación del VHS-1 y VHS-2 naturales, así como el virus VHS-1 mutante específicamente analizado en el texto. Las células Vero son un ejemplo de tipo de célula y se usan a continuación en el presente documento como ilustrativas.

Las células usadas se pueden unir por sí mismas a una matriz física sólida (por ejemplo, placa de plástico, perlas magnéticas, agarosa, etc.) o se pueden suspender en una solución líquida tal como un medio acuoso como una solución tampón tal como PBS. Los anticuerpos sometidos a inmunorreacción unidos a la matriz física se separan después de esto de los anticuerpos sin reaccionar presentes en la submuestra sometida a inmunorreacción. Esta separación se puede llevar a cabo mediante centrifugación y decantación o pipeteado del líquido sobrenadante, retirada de la pipeta como cuando el anticuerpo unido a antígeno se encuentra en las paredes de una placa de cultivo, elución y similares.

La mezcla e incubación analizadas anteriormente de cada una de las tres muestras de suero con una diferente de las matrices de antígeno celular también se denomina preadsorción en el presente documento. Esa preadsorción se puede llevar a cabo con células fijadas. En una divulgación, se usa el mismo tipo de célula para cada una de las preadsorciones para minimizar posibles reactividades cruzadas diferentes.

El propósito de la matriz de antígeno de células no infectadas, en cualquier forma específica que se use, es servir como un "control de tratamiento de preadsorción" que tiene poco o ningún efecto sobre la población de anticuerpos séricos humanos en una muestra problema obtenida de un paciente que busca determinar si están infectados por el VHS-1 y/o el VHS-2 (paneles más a la izquierda de datos brutos en las **FIG. 15-18** y resúmenes gráficos en las **FIG. 19 y 20**).

De forma similar, el propósito de la matriz de antígeno de células VHS-1<sup>+</sup>, en cualquier forma específica que se use, es retirar (1) los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y (2) los anticuerpos específicos contra el VHS-1 de la muestra de suero de un paciente. Por consiguiente, el efluente que se retira después de la incubación con la matriz de antígeno de células VHS-1<sup>+</sup> proporciona una población altamente enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-2, que se puede usar para determinar si un paciente se ha infectado por el virus VHS-2 (paneles centrales de datos brutos en las **FIG. 15-18** y resúmenes gráficos en las **FIG. 19 y 20**).

Del mismo modo, el propósito de la matriz de antígeno de células VHS-2<sup>+</sup>, en cualquier forma específica que se use, es retirar (1) los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y (2) los anticuerpos específicos contra el VHS-2 de la muestra de suero de un paciente. Por consiguiente, el efluente que se retira después de la incubación con la matriz de antígeno de VHS-2<sup>+</sup> proporciona una población altamente enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-1, que se puede usar para determinar si un paciente se ha infectado por el virus VHS-1 (paneles más a la derecha de datos brutos en las **FIG. 15-18** y resúmenes gráficos en las **FIG. 19 y 20**).

Como resultado de las preadsorciones, se forman al menos tres submuestras de suero preadsorbido. Por tanto, la submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos de células no infectadas (a) contiene una cantidad reducida de anticuerpos que inmunorreaccionan con células no infectadas. La submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos de células infectadas por el VHS-1 (b) contiene una cantidad reducida de anticuerpos que

inmunorreaccionan con células infectadas por el VHS-1 cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada, y, de este modo, una cantidad relativamente mayor de anticuerpos que inmunorreaccionan con el VHS-2, cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada. De forma similar, la submuestra de suero preadsorbido incubada con antígenos de células infectadas por el VHS-2 (c) contiene una cantidad reducida de anticuerpos que inmunorreaccionan con células infectadas por el VHS-2 cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada, y una cantidad relativamente mayor de anticuerpos que inmunorreaccionan con el VHS-1, cuando esos anticuerpos estaban presentes en la muestra de suero proporcionada.

En una divulgación, cada una de las partes de submuestras preadsorbidas se incuban (como se analiza anteriormente) con una mezcla de segundos antígenos problema unidos a matriz de células no infectadas por el VHS-1 o el VHS-2, antígenos problema de células infectadas por el VHS-1 y antígenos problema de células infectadas por el VHS-2 para permitir que los anticuerpos presentes dentro de cada submuestra inmunorreaccionen con los antígenos problema presentes. La cantidad de inmunorreacción, incluyendo poca o ninguna inmunorreacción, se determina a continuación para cada una de las submuestras con la mezcla de antígenos problema para determinar con cuál de los antígenos problema, si corresponde, inmunorreaccionaron los anticuerpos de las submuestras preadsorbidas.

En una divulgación, los segundos antígenos problema unidos a matriz utilizados en esta parte del ensayo divulgado pueden ser las mismas construcciones de antígeno problema-matriz física analizadas anteriormente, o construcciones diferentes. Por ejemplo, la mezcla de las tres matrices físicas de antígeno problema puede estar compuestas de células fijadas y permeabilizadas que están (a) sin teñir, (b) teñidas débilmente con un tinte celular, fluoróforo o colorante y (c) teñidas fuertemente con el mismo tinte celular, fluoróforo o colorante celular proporcionado de forma exógena, de modo que cada población de células problema se pueda distinguir entre sí en función de sus cantidades relativas de color de tinte o fluorescencia.

En un ejemplo particular, el colorante celular proporcionado de forma exógena (no presente normalmente como parte de las células) es fluorescente con irradiación, típicamente con longitudes de onda definidas de luz en el intervalo ultravioleta, visible o infrarrojo (200-800 nm), y su fluorescencia se puede detectar mediante un citómetro de flujo.

Los colorantes fluorescentes (de enlace covalente) reactivos químicamente proporcionados de forma exógena, útiles e ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, 5-(y 6)-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE), (CellTrace™ Violet) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il-7-(2-(((1E,3E,4E)-1,5-dicloro-6-oxohexa-1,4-dien-3-ilideno)amino)-5-hidroxifenil)octanoato (CellTrace™ Far Red DDAO-SE) que se unen a grupos amino tales como grupos épsilon-amino de residuos lisina por medio del intercambio de éster *N*-hidroxisuccinimida y colorantes reactivos al clorometilo tales como (2,3,6,7-tetrahidro-9-bromometil-1*H*,5*H*)-quinolizino(9,1-*gh*)-cumarina (CellTracker™ Violet BMQC), 7-amino-4-clorometil-cumarina (CellTracker™ Blue CMAC), 5-clorometil-fluoresceína diacetato (CellTracker™ Green) y 5-clorometilrodamina (CellTracker™ Red) (todos disponibles de Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) que tiñen las células por medio de una reacción con grupos tiol celulares. Las células también pueden marcarse de forma diferencial con una o más proteínas fluorescentes expresadas intracelularmente, incluyendo, pero sin limitación, proteína fluorescente verde (GFP), mCherry, tdTomato, KeimaRed, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CEP) como se analiza para GFP en Chalfie *et al.*, (1994) Science 263:802-805.

El colorante fluorescente introducido de forma exógena proporciona un medio por el cual cada población de antígenos celulares problema se pueden distinguir entre sí por fluorescencia. La emisión de fluorescencia desde el colorante celular proporcionado de forma exógena de las matrices que contienen el antígeno celular problema se puede distinguir de la emisión de fluorescencia de los anticuerpos secundarios analizados a continuación en el presente documento y la fluorescencia de cualquier otro material presente en el ensayo.

En una divulgación, se determina la cantidad de inmunorreacción para cada submuestra de suero preadsorbido que se combina con células problema y se detecta la unión del anticuerpo humano a cada población de células problema mediante marcado secundario con anticuerpos contra las globulinas humanas que se mezclan con células problema. En una divulgación, un marcador para los anticuerpos contra las globulinas humanas es un compuesto fluorescente unido covalentemente cuyo espectro de emisión de fluorescencia no se superpone con el espectro de emisión de fluorescencia del colorante usado para marcar de forma diferencial matrices de antígeno (i) no infectado, (ii) infectado por el VHS-1 e (iii) infectado por el VHS-2. Los tintes fluorescentes de enlace covalente ilustrativos que se pueden conjugar con un anticuerpo secundario contra las globulinas humanas incluyen, pero no se limitan a, alofocianina (APC), ficoeritrina (PE), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) y proteína peridina clorofila (PerCP).

En una divulgación, los anticuerpos sin reaccionar de las submuestras preadsorbidas se separan de los productos de inmunorreacción como se analizó previamente.

Además de usar un marcador fluorescente para los anticuerpos (secundarios) contra las globulinas humanas, se pueden conjugar covalentemente marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante (HRP),

fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa con los anticuerpos secundarios que se utilizan a menudo en los ensayos ELISA con un sustrato cromógeno, como son bien conocidos.

5 Los anticuerpos (secundarios) contra las globulinas humanas se producen en un animal distinto de un humano. Los anticuerpos secundarios ilustrativos incluyen aquellos producidos en cabras, burros, caballos, conejos, ratones y ratas. Estos anticuerpos contra las globulinas humanas pueden reaccionar con partes de anticuerpos contra Fc humano.

Al determinar a qué antígenos celulares problema se unen los anticuerpos presentes en cada una de las partes de submuestras preadsorbidas, se puede determinar de este modo si el paciente estaba infectado por el VHS-1, el VHS-2, los dos o ninguno.

10 Los procedimientos divulgados para detectar inmunofluorescencia para determinar cuáles, si alguna, de las submuestras preadsorbidas unidas a los antígenos celulares problema incluyen microscopía fluorescente, un lector de placas fluorescentes, un citómetro de flujo o un separador celular activado por fluorescencia. En el ensayo de la invención, se usa la citometría de flujo y, por lo tanto, se utiliza un citómetro de flujo o FACS, ya que dichas máquinas pueden medir ambos (1) el color fluorescente diferencial que indica si la matriz que contiene el antígeno celular problema no estaba infectada o era VHS-1<sup>+</sup> o VHS-2<sup>+</sup>, y el instrumento mide simultáneamente (2) un segundo color fluorescente que es indicativo de la variable primaria en estudio; a saber, la cantidad de anticuerpo humano unido a antígenos celulares problema no infectados frente a VHS-1<sup>+</sup> frente a VHS-2<sup>+</sup>.

El análisis a continuación en el presente documento describe el ensayo reivindicado que utiliza células fijadas como matrices que contienen el antígeno celular problema.

20 La presente invención también contempla un kit de ensayo serológico para llevar a cabo un ensayo descrito anteriormente. Un kit ilustrativo incluye a) tres recipientes separados que comprenden uno de (i) antígenos celulares de células no infectadas en una matriz física, (ii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-1 en una matriz física, o (iii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-2 en una matriz física. También se divulga un kit de ensayo serológico de este tipo en el que las matrices físicas en (ii) y (iii) pueden ser las mismas o diferentes de las de (i) y (iii), y (i) y (ii), respectivamente.

25 También se incluye un cuarto recipiente. Se divulga un cuarto recipiente que contiene una mezcla de antígenos celulares problema de células no infectadas por el VHS-1 o el VHS-2, antígenos de células infectadas por el VHS-1 y antígenos de células infectadas por el VHS-2, estando cada uno de esos antígenos celulares unido a una segunda matriz que es la misma o diferente de la matriz nombrada en primer lugar. El cuarto recipiente como se reivindica comprende una mezcla de tres poblaciones celulares fijadas, en la que la mezcla incluye células fijadas no infectadas por el VHS-1 o el VHS-2, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2, y en la que las poblaciones de células fijadas se pueden distinguir entre sí por la emisión de fluorescencia cuando se irradian. Cada uno de esos cuatro recipientes puede contener una cantidad suficiente del ingrediente citado para llevar a cabo al menos un ensayo.

35 Las instrucciones para llevar a cabo un ensayo también pueden estar presentes en el kit. Un kit contemplado se proporciona como un envase que contiene los componentes citados.

Los recipientes de un kit de ensayo contemplado están hechos típicamente de vidrio o un plástico al que los reactivos citados se adhieren escasamente, tal como recubrimientos de polietilenglicol (PEG) y recubrimientos de politetrafluoroetileno (PTFE).

40 El kit de ensayo serológico descrito anteriormente puede incluir además un quinto recipiente que contiene anticuerpos marcados contra las globulinas humanas en una cantidad suficiente para llevar a cabo al menos un ensayo. El marcador de los anticuerpos contra las globulinas humanas puede ser un material fluorescente cuya fluorescencia es distinguible de la fluorescencia de cualquier otro material presente. En un modo de realización, la mezcla de células fijadas del cuarto recipiente puede incluir además un colorante fluorescente introducido de manera exógena por el cual cada población de matrices de antígenos celulares problema se puede distinguir de las demás por la intensidad de las emisiones fluorescentes en una longitud de onda definida, y también se puede distinguir de cualquier otra especie fluorescente utilizada en el ensayo.

#### **Ensayo ilustrativo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares**

50 Un aspecto de la presente invención es el ensayo serológico reivindicado para determinar si un sujeto está infectado por el VHS-1, el VHS-2, los dos o ninguno. El ensayo comprende las etapas de mezclar por separado al menos tres submuestras de suero idénticas que comprenden anticuerpos con una de las tres poblaciones de antígenos celulares en una matriz física, separar los anticuerpos unidos a la matriz de las submuestras de suero preadsorbido, incubar las submuestras de suero preadsorbido con una mezcla que comprende tres poblaciones de células fijadas, incubar opcionalmente las submuestras de suero con un anticuerpo de detección, y medir la unión del anticuerpo analizando la mezcla de submuestras de suero-células por citometría de flujo.

El uno o más virus del herpes simple se seleccionan del grupo que comprende el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y el virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2).

5 En una divulgación, las al menos tres poblaciones de antígenos celulares en una matriz física pueden comprender células fijadas y permeabilizadas, por ejemplo células Vero, en la que una primera población no está infectada por el VHS-1 ni el VHS-2, una segunda población está infectada por el VHS-1 y una tercera población está infectada por el VHS-2.

10 En una divulgación, las al menos tres poblaciones de células problema en suspensión son células Vero, en la que una primera población no está infectada ni marcada, una segunda población está infectada por el VHS-1 y marcada con una baja concentración de una primera molécula fluorescente, y una tercera la población está infectada por el VHS-2 y marcada con una alta concentración de esa primera molécula fluorescente indicada. En una divulgación, la primera molécula fluorescente es de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE).

15 El anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo contra la IgG, y un anticuerpo contra la IgG humana donde el sujeto cuyo suero se analiza es humano. El anticuerpo de detección también se puede marcar con una segunda molécula fluorescente. La segunda molécula fluorescente debe tener un espectro de emisión de fluorescencia que no se superponga con el espectro de emisión de fluorescencia de la primera molécula fluorescente usada para marcar cada población de células problema. Una segunda molécula fluorescente adecuada es alofocianina (APC), pero también son adecuados muchos otros fluoróforos descritos en el presente documento.

20 El dispositivo de citometría de flujo puede ser cualquier dispositivo que pueda medir cuantitativamente la fluorescencia asociada con matrices problema individuales que contengan antígenos de un diámetro apropiado para el instrumento, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 micrones. Los ejemplos de dichas matrices problema que contienen antígenos de tamaño apropiado incluyen, pero no se limitan a, (1) células Vero no infectadas vivas, (2) células Vero no infectadas fijadas y permeabilizadas, (3) células Vero infectadas por el VHS-1 vivas, (4) células Vero infectadas por el VHS-1 fijadas y permeabilizadas, (5) células Vero infectadas por el VHS-2 vivas o (6) células Vero infectadas por el VHS-2 fijadas y permeabilizadas. El dispositivo de separación celular puede ser un citómetro de flujo, pero se puede usar un separador celular activado por fluorescencia (FACS) para el mismo propósito, aunque, en general, dichos instrumentos son aproximadamente 20 veces más caros y, por tanto, se reservan para el acto de "separar células" (de ahí la denominación del instrumento) basado en la intensidad de fluorescencia, a diferencia de la tarea más rudimentaria de medir la intensidad de fluorescencia 25 asociada con células, que, en general, se realiza con un citómetro de flujo.

### 30 **Unión de anticuerpos a células infectadas por virus (ABVIC): un procedimiento más sensible que ELISA para medir los anticuerpos IgG contra Pan-VHS-2 - Dos estudios celulares**

35 Como se analiza en el presente documento, la presencia de anticuerpos IgG en suero que se unen a todos los antígenos del VHS-2 (35 IgG de pan-VHS-2) se puede visualizar mediante inmunotinción fluorescente roja de placas de VHS-2 en monocapas de células Vero (FIG. 1A y 1B). El suero no sometido previamente a experimentación carece de anticuerpos contra el VHS-2 y, por tanto, no se produce una tinción inmunofluorescente roja de células VHS-2<sup>+</sup> (FIG. 1A). El suero de animales inmunes al VHS-2 contiene anticuerpos contra el VHS-2 que proporcionan tinción inmunofluorescente roja en esta prueba (FIG. 1B). El novedoso ensayo ABVIC se basa en este mismo principio, pero este ensayo es mucho más cuantitativo porque someter a prueba anticuerpos se realiza en poblaciones de células aisladas en suspensión que se pueden analizar para determinar la tinción 40 inmunofluorescente roja en un citómetro de flujo (eje de ordenadas en las FIG. 1C y 1D).

Este ensayo se denomina "ensayo ABVIC" porque mide la unión del anticuerpo a células infectadas por el virus. Las células infectadas por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>) se marcan con un fluoróforo verde, CFSE, mientras que las células no infectadas (NI) carecen de este marcador, lo que permite diferenciar las dos poblaciones celulares en un citómetro de flujo (eje de abscisas de las FIG. 1C y 1D).

45 Se incubaron suspensiones de células problema con suero de ratones no sometidos previamente a experimentación o ratones inmunizados, y se detectó la cantidad de anticuerpo IgG unido a células NI o VHS-2<sup>+</sup> por medio de un anticuerpo secundario contra IgG de ratón que tenía un marcador fluorescente rojo (alofocianina; APC) (eje de ordenadas de las FIG. 1C y 1D). Cuando las células se incubaron con suero de ratón no sometido previamente a experimentación, se unieron concentraciones similares de anticuerpo IgG a células VHS-2<sup>+</sup> y NI. Específicamente, la intensidad fluorescente media (MFI) fue de aproximadamente 7000 en ambas poblaciones (FIG. 1C). Por el contrario, cuando se incubaron suspensiones celulares con suero de un ratón vacunado contra el VHS-2, la unión del anticuerpo a las células VHS-2<sup>+</sup> (MFI aproximadamente 600 000) fue aproximadamente 20 veces más alta que a las células NI (FIG. 1D).

55 Se compararon punto por punto el ELISA de captura de anticuerpos y el ABVIC para comparar su sensibilidad relativa (FIG. 9C). Se representaron gráficamente en el eje de abscisas las estimaciones mediante ELISA de log (IgG de pan-VHS-2) en  $n = 48$  ratones, mientras que las estimaciones mediante ABVIC de los mismos ratones se representaron gráficamente en el eje de ordenadas (FIG. 9C). Si los dos procedimientos eran igualmente sensibles, los puntos de referencia se debían dispersar a continuación alrededor de una línea de equivalencia '0 log'. Sin

embargo, 35 de las 36 muestras positivas cayeron por encima de la línea de equivalencia y el ensayo ABVIC proporcionó estimaciones de  $5 \pm 1$  veces más altas de la abundancia de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 que ELISA (FIG. 9C). Este es uno de los varios análisis que apoyaron la conclusión de que el ensayo ABVIC era más sensible y preciso que las estimaciones basadas en ELISA de la abundancia de anticuerpos específicos contra el VHS.

#### **El ensayo ABVIC de dos poblaciones celulares demuestra que dos de cuatro pacientes con "VHS-2 indeterminado" son seronegativos**

Se han obtenido muestras clínicas de suero periódicamente de Terri Warren (Westover Heights Clinic) desde 2011. Quorum IRB (Seattle, WA) y el Comité Springfield para Investigación en Sujetos Humanos de SIU School of Medicine concluyeron que la investigación estaba "exenta", ya que solo se evaluaron sueros desidentificados. Un análisis de sueros humanos que usa el ensayo ABVIC se describe como sigue.

Sueros de  $n = 3$  sujetos seronegativos definieron el nivel de fondo de la unión de anticuerpos a células VHS-2<sup>+</sup> y células NI (FIG. 10A). Los sueros de  $n = 3$  pacientes con herpes genital por el VHS-2 poseían anticuerpos que se unían a células VHS-2<sup>+</sup> a niveles de 10 a 20 veces más altos que las células NI (FIG. 10B). Se sometieron a prueba en el ensayo ABVIC sueros de cuatro pacientes cuyo estado serológico era indeterminado por HerpeSelect® ELISA e inmunoelectrotransferencia para el VHS. El ensayo ABVIC demostró que las muestras de suero indeterminadas 1 y 2 eran en realidad seronegativas para el VHS-2 (FIG. 10C). Los sueros de las muestras de suero indeterminadas 3 y 4 proporcionaron un resultado positivo para el VHS (FIG. 10D), pero el ensayo ABVIC no logró discriminar si estos sujetos estaban infectados por el VHS-1, el VHS-2 o los dos virus. Se tomaron otras medidas para superar esta limitación y desarrollar un ensayo ABVIC específico para el tipo de VHS.

#### **El ensayo ilustrativo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares**

Se emplearon dos modificaciones para convertir el ensayo ABVIC de dos poblaciones celulares en el ensayo ABVIC específico para el tipo de VHS de tres poblaciones celulares. Estos cambios fueron: 1) preadsorción de suero a células NI, células VHS-1<sup>+</sup> o células VHS-2<sup>+</sup> (FIG. 11); y 2) someter a prueba suero preadsorbido contra tres poblaciones de células NI frente a células infectadas por el VHS-1<sup>+</sup> frente a células infectadas por el VHS-2<sup>+</sup> (FIG. 12).

Con respecto a la preadsorción de suero, los pacientes infectados por el VHS-1 y/o el VHS-2 poseen hasta tres poblaciones de anticuerpos contra el VHS: 1) anticuerpos comunes contra todos los tipos que se unen a las proteínas de antígeno de VHS-1 y VHS-2 (Z en la FIG. 11); 2) anticuerpos específicos contra el VHS-1 que solo se unen a proteínas de antígeno de VHS-1 (X en la FIG. 11); y 3) anticuerpos específicos contra el VHS-2 que solo se unen a proteínas de antígeno de VHS-2 (Y en la FIG. 11).

Se puede obtener una población enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-2 preadsorbiendo suero de un sujeto (humano u otro animal) infectado por el VHS a células fijadas VHS-1<sup>+</sup>, lo que disminuye los anticuerpos comunes contra todos los tipos y específicos contra el VHS-1 (columna central, FIG. 11), y aumenta la concentración relativa de cualquier anticuerpo contra el VHS-2 que esté presente. Del mismo modo, se puede obtener una población enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-1 preadsorbiendo suero a células VHS-2<sup>+</sup> (columna derecha, FIG. 11). La preadsorción a células NI (columna izquierda, FIG. 11) controla cualquier efecto del procedimiento.

Con respecto al ensayo de tres poblaciones celulares, se desarrolló un protocolo optimizado de marcado con CFSE que proporciona poblaciones de células NI (sin CFSE), células VHS-1<sup>+</sup> (CFSE<sup>10</sup>) y células VHS-2<sup>+</sup> (CFSE<sup>10</sup>), que se puede resolver en un citómetro de flujo (FIG. 12). Las células NI aparecen a la izquierda de una curva de dos colores, mientras que las células VHS-1<sup>+</sup> y VHS-2<sup>+</sup> están marcadas con concentraciones de CFSE bajas (lo) y altas (hi), y, por tanto, aparecen como poblaciones central y derecha, respectivamente (FIG. 12A). Combinando la preadsorción de suero y este ensayo de tres poblaciones celulares, se ha conseguido un ensayo de unión de anticuerpos a células infectadas por virus (*antibody-binding to virus-infected cells*, ABVIC) específico para el tipo de VHS. Se presentan resultados representativos, como sigue.

Se incubó una muestra de suero seronegativo con células problema después de la preadsorción a cada población celular. Después de la preadsorción a células NI, se observó una unión de anticuerpo despreciable a las células (gráfico de la izquierda, FIG. 12A). Se obtuvieron resultados similares después de la preadsorción a células VHS-1<sup>+</sup> o células VHS-2<sup>+</sup> (gráficos del centro y de la derecha, FIG. 12A).

Se incubó suero de un sujeto seropositivo para el VHS-2 conocido con células problema después de la preadsorción a cada población celular. Después de la preadsorción a células NI, los anticuerpos específicos contra el VHS se unieron a células VHS-1<sup>+</sup> y VHS-2<sup>+</sup> hasta niveles 10 y 15 veces más altos que a las células NI, respectivamente (gráfico de la izquierda, FIG. 12B). Cuando se preadsorbió suero a células VHS-1<sup>+</sup>, se mantuvieron altas concentraciones de anticuerpos específicos contra el VHS-2 y se unieron a células VHS-2<sup>+</sup> (recuadro, gráfico central, FIG. 12B); por consiguiente, este paciente era seropositivo para el VHS-2. Cuando se preadsorbió el suero de este paciente a células VHS-2<sup>+</sup>, se destruyó la unión de los anticuerpos a células VHS-1<sup>+</sup> (recuadro, gráfico de la

derecha, FIG. 12B); por consiguiente, este paciente era seronegativo para el VHS-1. Estos resultados fueron consecuentes con las pruebas anteriores de inmunolectrotransferencia.

La muestra de suero indeterminada 3 analizada previamente se incubó con células problema después de las preadsorciones de submuestras separadas a cada una de las tres poblaciones celulares. Después de la preadsorción a células NI, los anticuerpos específicos contra el VHS se unieron a células VHS-1<sup>+</sup> y VHS-2<sup>+</sup> hasta niveles 100 y 20 veces más altos que a las células NI, respectivamente (gráfico de la izquierda, FIG. 12C). Cuando se preadsorbió el suero a células VHS-1<sup>+</sup>, se destruyó la unión de los anticuerpos a células VHS-2<sup>+</sup> (recuadro, gráfico central, FIG. 12C); por consiguiente, este paciente era seronegativo para el VHS-2. Cuando se preadsorbió el suero a células VHS-2<sup>+</sup>, se mantuvieron altas concentraciones de anticuerpos específicos contra el VHS-1 (recuadro, gráfico de la derecha, FIG 12C); por consiguiente, este paciente era seropositivo para el VHS-1.

Estos hallazgos indicaron que el paciente que proporcionó la muestra de suero indeterminada 3 estaba infectado por el VHS-1, pero no por el VHS-2 en el momento en que se obtuvo la muestra de suero. La muestra de suero indeterminada 4 proporcionó resultados equivalentes (no mostrados). Por lo tanto, el ensayo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares demostró que las muestras de suero indeterminadas 3 y 4 eran tanto seronegativas para el VHS-2 como seropositivas para el VHS-1.

Las muestras de suero indeterminadas para el VHS-2 1, 2, 3 y 4 representan a cuatro pacientes a los que podía haberse ahorrado una gran cantidad de ansiedad y sufrimiento si estuviera disponible un mejor ensayo serológico para el VHS para informarles apropiadamente de que no estaban infectados por el VHS-2 y, por tanto, no podían transmitir el herpes genital por el VHS-2 a ningún contacto sexual.

#### **El ensayo ilustrativo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares es más sensible que HerpeSelect®**

El ensayo HerpeSelect® (Quest Diagnostics, Inc.) es un ELISA de captura de anticuerpos que somete a prueba la presencia de anticuerpos específicos contra la glucoproteína G del VHS-1 (gG-1) o del VHS-2 (gG-2) [Whittington *et al.*, 2001]. Estas son dos de las proteínas del VHS más divergentes conocidas [Sánchez-Martínez *et al.*, 1991; Roizman *et al.*, 1984]. Los pacientes infectados por el VHS-1 pueden montar una producción de anticuerpos contra 30 proteínas del VHS-1, incluida gG-1, y, del mismo modo, la infección por el VHS-2 puede impulsar una producción de anticuerpos contra 30 proteínas del VHS-2, incluida gG-2 [Norrild *et al.*, 1981; Gilman *et al.*, 1981] (FIG. 13A y 13C).

Una debilidad crítica del ensayo HerpeSelect® de detección del VHS-2 es que solo somete a prueba anticuerpos contra gG-2, que representan un 3-10 % del repertorio total de anticuerpos específicos contra el VHS-2 de una persona infectada (FIG. 13B frente a 13C). La prueba HerpeSelect® no considera el otro 90-97 % de los anticuerpos específicos contra el VHS-2 dirigidos contra gB, gC, gE, gH y otros 25 antígenos principales del VHS-2. Una prueba con el potencial de detectar todos los anticuerpos específicos contra el VHS-2 debe ofrecer un incremento de 10 a 30 veces en la sensibilidad con respecto a la prueba HerpeSelect® (FIG. 13B frente a 13C). El ensayo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares logra este objetivo usando antígenos celulares de células VHS-2<sup>+</sup> fijadas y permeabilizadas como reactivo de prueba, que contiene alrededor de 75 proteínas del VHS-2, y, por tanto, se puede unir a todos los anticuerpos específicos contra el VHS-2.

#### **El ensayo ilustrativo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares es más sensible que la inmunolectrotransferencia**

El ensayo ABVIC específico para el tipo de tres poblaciones celulares es único entre los ensayos serológicos de detección del VHS, ya que somete a prueba anticuerpos específicos de tipo pan-VHS, se controla internamente y se basa en miles de mediciones repetidas. En el ensayo ABVIC, se mide la concentración de anticuerpos IgG de un paciente que se unen a miles de células VHS-2<sup>+</sup> frente a células NI, y se comparan estas cantidades con las producidas por un panel de sueros seronegativos de control y seropositivos para el VHS-2.

Por tanto, el valor de corte entre "seronegativo" y "seropositivo" se puede establecer en cualquier nivel de significación estadística que se considere apropiado (por ejemplo, la probabilidad de que el paciente que proporcionó la muestra de suero indeterminada 3 fuera seropositivo para el VHS-2 era inferior a 1 en un millón FIG. 12C;  $p < 0,000001$ ). Por el contrario, el análisis por inmunolectrotransferencia es un ensayo cualitativo y no se presta a asignar probabilidades determinadas estadísticamente a un diagnóstico de "seronegativo para el VHS-2".

#### **Detección de la unión de anticuerpos humanos a células problema (i) no infectadas, (ii) VHS-1<sup>+</sup> y/o (iii) VHS-2<sup>+</sup>**

**A. Microscopia por inmunofluorescencia.** Es posible determinar si una muestra de suero del paciente contiene un anticuerpo específico contra el VHS-2 comparando su capacidad para unirse a células no infectadas frente a células infectadas por el virus en el contexto de monocapas de células Vero que están infectadas por una pequeña cantidad de virus VHS-1 o VHS-2 que puede formar pequeños focos de infección (también conocidas como "placas"). En este modo de realización de la prueba ABVIC específica para el tipo, la unión de anticuerpos humanos a células infectadas por el virus se podría visualizar con un microscopio de fluorescencia (FIG. 23-24). Convertir un sistema

experimental de este tipo en una prueba para "anticuerpo específico contra el VHS-2" se podría lograr con tres elementos, tales como:

1. Placas de VHS-1 en una monocapa de células de mamífero;
2. Placas de VHS-2 en una monocapa de células de mamífero;
- 5 3. Matrices de antígeno no infectado (NI), antígeno VHS-1<sup>+</sup> y antígeno VHS-2<sup>+</sup>.

Un ejemplo específico de dicha prueba se ilustra en la FIG. 23, donde la línea de células de mamífero utilizada es la línea celular de riñón de mono verde africano conocida como "células Vero" y la matriz que se usó para inmovilizar antígenos para la preadsorción fue Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (GE Healthcare Life Sciences). Cabe destacar que tanto las placas de VHS-1 como las de VHS-2 (es decir, las áreas de células infectadas por el virus) están rodeadas por "áreas negras" de células no infectadas (NI) donde el virus aún no había llegado en el momento de la recolección y fijación celular.

Por consiguiente, la diferencia en la media de intensidad de la fluorescencia roja ("mean red fluorescent intensity",  $\Delta\text{MFI}$ ) es lo que uno ojo observa que le dice a uno que este sujeto debe poseer "anticuerpo específico contra el VHS", y esta es precisamente la misma cantidad que se está comparando en la variación más cuantitativa basada en citometría de flujo de la prueba ABVIC específica para el tipo. En las imágenes de la **FIG. 23**, la unión a anticuerpo se visualizó con el anticuerpo "caprino contra IgG humana conjugado con AlexaFluor594", que produce el color rojo capturado en las fotomicrografías.

Específicamente, se usó suero de un paciente que se sabía que era seropositivo para el VHS-2 para validar que estos tres conjuntos de reactivos eran útiles para someter a prueba la presencia de anticuerpos específicos contra el VHS-2. Comenzando en la parte superior de los paneles mostrados en la **FIG. 23A**, cuando la muestra de suero de este paciente se diluyó 1:2000 y no se preadsorbió a ninguna matriz de antígeno, contenía una mezcla de anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y anticuerpos específicos contra el VHS-2 que se unían conjuntamente tanto a (i) las placas de VHS-1 mostradas a la izquierda como a (ii) las placas de VHS-2 mostradas a la derecha. Por consiguiente, el suero no adsorbido del paciente fue insuficiente para determinar si este sujeto estaba infectado por el VHS-1 y/o el VHS-2.

Cuando la muestra de suero de este paciente se diluyó 1:2000 y se preadsorbió en una matriz de antígenos de células no infectadas (NI), todavía contenía una mezcla de anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y anticuerpos específicos contra el VHS-2 que se unían conjuntamente tanto a (i) las placas de VHS-1 mostradas a la izquierda como a (ii) las placas de VHS-2 mostradas a la derecha. Por consiguiente, el suero del paciente preadsorbido al antígeno de células NI fue insuficiente para determinar si este sujeto estaba infectado por el VHS-1 y/o el VHS-2 (**FIG. 23B**).

Cuando la muestra de suero de este paciente se diluyó 1:2,000 y se preadsorbió a una matriz de antígenos de células infectadas por el VHS-1 (VHS-1<sup>+</sup>), disminuyeron los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS, pero se mantuvieron los anticuerpos específicos contra el VHS-2. Por consiguiente, la población enriquecida de anticuerpos específicos contra el VHS-2 solo se unieron escasamente a las placas de VHS-1 de la izquierda, pero se unieron fuertemente a las placas de VHS-2 mostradas a la derecha. El suero del paciente preadsorbido a antígeno de células de VHS-1 fue suficiente para determinar que este sujeto era seropositivo para el VHS-2, que es un pronóstico de una infección subyacente por el VHS-2 (**FIG. 23C**).

Finalmente, cuando la muestra de suero de este paciente se diluyó 1:2,000 y se preadsorbió a una matriz de antígeno de células infectadas por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>), disminuyeron los anticuerpos comunes contra todos los tipos de VHS y los anticuerpos específicos contra el VHS-2. Si este paciente estuviera infectado por el VHS-1 y, por tanto, fuera seropositivo para el VHS-1, seguirían presentes los anticuerpos específicos contra el VHS-1. Sin embargo, lo que se observa en el panel final es que el suero preadsorbido a VHS-2 no poseía anticuerpos que se unieran a las placas de VHS-1 a la izquierda a un nivel más alto que las placas de VHS-2 mostradas a la derecha. Por consiguiente, este suero del paciente preadsorbido a antígeno de células infectadas por el VHS-2 fue suficiente para determinar que este sujeto era seronegativo para el VHS-1 (**FIG. 23D**).

En la **FIG. 24**, se muestran los resultados de una prueba idéntica usando el suero de un paciente que se sabía que era seropositivo para el VHS-1 y el VHS-2. Usando el mismo razonamiento ofrecido en la **FIG. 23**, los datos obtenidos con el suero preadsorbido a antígeno de células infectadas por el VHS-1 del paciente muestran que el sujeto es seropositivo para el VHS-2 (**FIG. 24C**). Del mismo modo, los datos obtenidos con el suero preadsorbido a antígeno de células infectadas por el VHS-2 del paciente muestran que el sujeto es seropositivo para el VHS-1 (**FIG. 24D**).

**B. Citometría de flujo.** Se puede determinar si una muestra de suero de un paciente contiene anticuerpos específicos contra el VHS-2 comparando su capacidad de unirse a células no infectadas frente a células infectadas por el virus en el contexto de suspensiones de células de mamífero no infectadas, infectadas por el VHS-1 e infectadas por el VHS-2. En este modo de realización del ensayo ABVIC específico para el tipo, la unión de anticuerpos humanos a células infectadas por el virus se podría medir cuantitativamente usando un citómetro de flujo (**FIG. 15-18**).

Dicho sistema experimental se puede usar para medir el "anticuerpo específico contra el VHS-2" utilizando los tres elementos de:

1. Células de mamífero infectadas por el VHS-1;
2. Células de mamífero infectadas por el VHS-2; y
- 5 3. Tres poblaciones de matrices de antígeno de células problema no infectadas (NI), antígeno de células problema infectadas por el VHS-1 y antígeno de células problema infectadas por el VHS-2.

Un ejemplo específico de dicha prueba se ilustra en las **FIG. 15-18**, donde la línea de células de mamífero usada fue células Vero, y la matriz de antígeno que se usó fueron suspensiones fijadas en formaldehído y metanol y permeabilizadas de células Vero que no estaban infectadas o estaban infectadas por el VHS-1 o infectadas por el VHS-2.

En este modo de realización particular del ensayo ABVIC, la unión de los anticuerpos de un paciente a la suspensión de células problema que contenía células NI, células VHS-1<sup>+</sup> y células VHS-2<sup>+</sup> fijadas y permeabilizadas se midió usando anticuerpo "caprino contra IgG humana conjugado con alofococianina (APC)", que produce un color rojo lejano que se mide en el canal FL4 de un citómetro de flujo (ejes de ordenadas en cada subpanel en las **FIG. 15-18**). Específicamente, en cada panel, la comparación mostrada es la cantidad de anticuerpo humano unido a células no infectadas (NI), que sirven como control de fondo, frente a la unión del anticuerpo a células VHS-1<sup>+</sup> o células VHS-2<sup>+</sup>. En este modo de realización particular del ensayo ABVIC específico para el tipo, las tres poblaciones de células problema se están diferenciando en el canal FL1 de un citómetro de flujo mediante marcado diferencial con el fluoróforo verde carboxifluoresceína *N*-succinimidil éster (CFSE).

Los datos en la **FIG. 14** validan que las poblaciones puras de células NI (**FIG. 14A**), células VHS-1<sup>+</sup> (**FIG. 14B**) o células VHS-2<sup>+</sup> (**FIG. 14C**) marcadas de forma diferencial con CFSE se puedan diferenciar fácilmente a un nivel de confianza >99,7 % con un citómetro de flujo. Del mismo modo, los datos en las **FIG. 15-18** demuestran directamente que una mezcla de las 3 poblaciones de células problema todavía se diferencian fácilmente en el canal FL1, que deja el canal FL4 (color rojo lejano) libre para medir la diferencia en la media de la intensidad de fluorescencia roja ("difference in mean fluorescent intensity",  $\Delta\text{MFI}$ ) entre células infectadas por el VHS frente a células NI, lo que se correlaciona directamente con la cantidad de anticuerpo específico contra el VHS unido a subpoblaciones de células infectadas por el VHS frente a células de control de fondo NI (Halford, *et al.*, 2013).

La **FIG. 15** ilustra la cantidad en el fondo de unión del anticuerpo a células VHS-1<sup>+</sup> y células VHS-2<sup>+</sup> frente a células de control de fondo no infectadas (NI) cuando estas poblaciones de células problema se combinan con el suero de 4 sujetos que se sabe que son seronegativos para el VHS (**FIG. 15A-15D**).

Hay tres características cuantitativas importantes que son exclusivas del modo de realización basado en citometría de flujo de la prueba ABVIC específica para el tipo y son como sigue:

1. Las estimaciones de la concentración de "anticuerpo específico contra el VHS" se basan en la diferencia en la media de la intensidad fluorescente ( $\Delta\text{MFI}$ ) en el canal FL4 (eje de ordenadas) entre  $n$  aproximadamente 20 000 células NI frente a  $n$  aproximadamente 20 000 células VHS-1<sup>+</sup> frente a  $n$  aproximadamente 20 000 células VHS-2<sup>+</sup>, lo que proporciona un alto grado de confianza en las estimaciones cuantitativas de abundancia de anticuerpos específicos contra el VHS en la sangre de un paciente;

2. Las células NI proporcionan un control interno que define el fondo del ensayo y, por consiguiente, el ensayo es insensible para los pacientes cuya sangre posee anticuerpos que causan una señal de fondo más alta, que es una variable importante que actúa como factor de confusión del ensayo HerpeSelect® y las inmunoelectrotransferencias para el virus del herpes, y probablemente explique al menos un 50 % de los resultados "indeterminados" que inducen a muchas personas a la conclusión errónea de que están infectados por el VHS-2/son seropositivos para el VHS-2; y

3. Definir la media y la desviación estándar de la  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-1}}$  asociada con las células VHS-1<sup>+</sup> ( $\text{MFI}_{\text{VHS-1}} - \text{MFI}_{\text{NI}}$ ) y la media y la desviación estándar de la  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-2}}$  asociada con las células VHS-2<sup>+</sup> ( $\text{MFI}_{\text{VHS-2}} - \text{MFI}_{\text{NI}}$ ) crea la oportunidad para el análisis estadístico de la probabilidad de que un paciente dado sea seronegativo para el VHS-1 o el VHS-2 basada en dónde caen sus propios valores de  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-1}}$  o  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-2}}$  en la distribución normal de los valores de  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-1}}$  o  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-2}}$  para las muestras seronegativas para el VHS de control (**FIG. 21 y 22**). En base a estas consideraciones, el fondo  $1x$  se establece igual al promedio de todos los valores de  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-1}}$  y  $\Delta\text{MFI}_{\text{VHS-2}}$  en los controles seronegativos para el VHS.

La **FIG. 16** ilustra los datos producidos por el modo de realización basado en citometría de flujo de la prueba ABVIC específica para el tipo con sujetos que se sabe (en base a la inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes) que son seropositivos para el VHS-1 (**FIG. 16A**), seropositivos débiles para el VHS-2 (**FIG. 16B**), seropositivos fuertes para el VHS-2 (**FIG. 16C**) o seropositivos dobles para el VHS-1/VHS-2 (**FIG. 16D**). Cada tipo de sujeto se considera como sigue

Para los sujetos que son seropositivos para el VHS-1, la muestra de suero "preadsorbido NI" de control (panel izquierdo en la **FIG. 16A**) muestra una  $\Delta MF I_{VHS-1}$  que está 63 veces por encima del fondo y una  $\Delta MF I_{VHS-2}$  que está 11 veces por encima del fondo. Cuando la misma muestra de suero se preadsorbe en una matriz de antígeno de VHS-1, se retiran los anticuerpos comunes contra todos los tipos y los anticuerpos específicos contra el VHS-1. Por consiguiente, en el panel central de la **FIG. 16A**, la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  se reduce a 1,0 veces por encima del fondo y la  $\Delta MF I_{VHS-2}$  se reduce hasta aproximadamente 1,4 veces por encima del fondo, lo que indica que esta persona no posee anticuerpos específicos contra el VHS-2. Finalmente, cuando la misma muestra de suero se preadsorbe en una matriz de antígeno de VHS-2, se retiran los anticuerpos comunes contra todos los tipos y los anticuerpos específicos contra el VHS-2. Por lo tanto, en el panel más a la derecha de la **FIG. 16A**, la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  se restablece a 41 veces por encima del fondo, lo que indica, por consiguiente, que esta persona tiene un alto título de anticuerpos específicos contra el VHS-1.

En base a consideraciones estadísticas posteriores (**FIG. 21-22**), se pueden llegar a las siguientes conclusiones matemáticas sobre el sujeto cuya sangre se extrajo para el análisis presentado en la **FIG. 16A** (denominado al paciente que proporcionó la muestra de suero "paciente 16A"):

- 15 - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 16A sea seronegativo para el VHS-1 es de menos de un 0,01 %.
- VHS-2: La probabilidad de que el paciente 16A sea seronegativo para el VHS-2 es de un 55 %.
- Conclusión: El paciente 16A es seropositivo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.

Para los sujetos que son seropositivos para el VHS-2, la muestra de suero "preadsorbido NI" de control (paneles de la izquierda en la **FIG. 16B** y la **FIG. 16C**) muestra una  $\Delta MF I_{VHS-1}$  que está 7 y 30 veces por encima del fondo y muestra una  $\Delta MF I_{VHS-2}$  que está 8 y 47 veces por encima del fondo, respectivamente. Cuando estas muestras de suero se preadsorbieron a una matriz de antígeno de VHS-1 (panel central de la **FIG. 16B** y la **FIG. 16C**), la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  se reduce hasta aproximadamente 0,2 y 0,9 veces por encima del fondo, respectivamente, mientras que la  $\Delta MF I_{VHS-2}$  solo se reduce a 4 y 29 veces por encima del fondo, lo que indica que ambos sujetos parecen poseer anticuerpos específicos contra el VHS-2. Finalmente, cuando estas mismas muestras de suero se preadsorbieron a una matriz de antígeno de VHS-2 (panel más a la derecha), la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  del paciente n.º 1 se reduce a 0,3, lo que indica que es claramente seronegativo para el VHS-1 (**FIG. 16B**), mientras que la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  del paciente n.º 2 permanece 4,2 veces por encima del fondo (**FIG. 16C**). En base a consideraciones estadísticas posteriores (**FIG. 21-22**), se pueden llegar a las siguientes conclusiones matemáticas sobre estos sujetos analizados en la **FIG. 16B** y la **FIG. 16C** (como "paciente 16B" también "Paciente n.º 1" y "paciente 16C" también "Paciente n.º 2"):

- 30 - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 16B sea seronegativo para el VHS-1 es de un 87 %.
- VHS-2: La probabilidad de que el paciente 16B sea seronegativo para el VHS-2 es de un 0,1 %.
- Conclusión: El paciente 16B es seronegativo para el VHS-1 y seropositivo para el VHS-2.
- VHS-1: La probabilidad de que el paciente 16C sea seronegativo para el VHS-1 es de un 3 %.
- VHS-2: La probabilidad de que el paciente 16C sea seronegativo para el VHS-2 es de menos de un 0,01 %.
- 35 - Conclusión: El paciente 16C es equívoco para el VHS-1 y es seropositivo para el VHS-2.

Para el sujeto que es seropositivo para el VHS-1 y seropositivo para el VHS-2, la muestra de suero "preadsorbido NI" de control (panel izquierdo en la **FIG. 16D**) muestra una  $\Delta MF I_{VHS-1}$  que está 290 veces por encima del fondo y una  $\Delta MF I_{VHS-2}$  que está 100 veces por encima del fondo. Cuando esta muestra de suero se preadsorbió a una matriz de antígeno de VHS-1 (panel central de la **FIG. 16D**), la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  se reduce a 2 veces por encima del fondo, mientras que la  $\Delta MF I_{VHS-2}$  solo se reduce a 52 veces por encima del fondo, lo que indica que este sujeto parece poseer anticuerpos específicos contra el VHS-2. Cuando esta muestra de suero se preadsorbió a una matriz de antígeno de VHS-2 (panel más a la derecha), la  $\Delta MF I_{VHS-1}$  solo se reduce a 95 veces por encima del fondo, lo que indica que son claramente seropositivos para el VHS-1 (**FIG. 16D**). En base a consideraciones estadísticas posteriores (**FIG. 21-22**), se pueden llegar a las siguientes conclusiones matemáticas sobre este sujeto:

- 45 - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 16D sea seronegativo para el VHS-1 es de menos de un 0,01 %.
- VHS-2: La probabilidad de que el paciente 16D sea seronegativo para el VHS-2 es de menos de un 0,01 %.
- Conclusión: El paciente 16D es seropositivo para el VHS-1 y es seropositivo para el VHS-2.

**Preadсорción de anticuerpos humanos a matrices de antígenos no infectados, VHS-1+ o VHS-2+.**

**A. Preadсорción a matriz de Sepharose® 4B activada con CNBr.**

Se muestran ejemplos del uso de Sepharose® 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) (GE Healthcare Life Sciences) como una matriz de antígeno de células NI o infectadas por el VHS-1 o el VHS-2 para la etapa de preadsorción en la prueba ABVIC específica para el tipo en las **FIG. 23 y 24**.

#### **B. Preadсорción a células Vero fijadas unidas a una matriz sólida.**

5 En las **FIG. 15, 16, 17 y 18** se muestran ejemplos del uso de células Vero fijadas y permeabilizadas como una matriz de antígeno de células NI o infectadas por el VHS-1 o el VHS-2 para la etapa de preadsorción en la prueba ABVIC específica para el tipo. En esta prueba particular, se fijaron células Vero NI, VHS-1<sup>+</sup> o VHS-2<sup>+</sup> al sustrato de la placa de plástico en la que se cultivaron, y esto sirvió como matriz de antígeno celular a la que se preadsorbió suero humano. De forma similar, se han usado suspensiones de células Vero NI, VHS-1<sup>+</sup> o VHS-2<sup>+</sup> como una matriz de antígeno celular para la preadsorción de suero humano antes del análisis por citometría de flujo de la unión del anticuerpo humano a las células problema.

15 Las células problema fijadas o las matrices de antígeno celular que (i) no están infectadas o son (ii) VHS-1<sup>+</sup> y/o (iii) VHS-2<sup>+</sup> son estables a lo largo del tiempo. El concepto de fijación, como implica el término, supone "fijar" un tejido biológico en una forma que no se descompone y, por tanto, es estable a lo largo del tiempo. Esta es la base del embalsamamiento de humanos para preparativos funerarios, que se practicó en el antiguo Egipto para producir momias conservadas. El uso de fijadores tales como formaldehído, metanol, etanol, acetona, etc. ha sido común en biología desde el siglo XIX. En estudios en los laboratorios del inventor, (1) suspensiones de células problema Vero fijadas no infectadas, VHS-1<sup>+</sup> o VHS-2<sup>+</sup> o (2) matrices de antígeno de células no infectadas, VHS-1<sup>+</sup> o (iii) VHS-2<sup>+</sup> son estables a 4 °C durante al menos 1 mes.

20 La prueba de anticuerpos de controles no infectados (NI) es suficiente para distinguir seronegativos para el VHS de seropositivos para el VHS, pero no diferencia si una persona está infectada por el VHS-1, el VHS-2 o los dos. La columna más a la izquierda de paneles en la **FIG. 16D** ilustra que todos los sujetos seropositivos para el VHS-1 y seropositivos para el VHS-2 poseen anticuerpos comunes contra los dos tipos que reaccionan de forma cruzada con células problema Vero VHS-1<sup>+</sup> y VHS-2<sup>+</sup>. Por tanto, en ausencia de preadsorción o después de la preadsorción a células NI, es imposible diferenciar claramente si un paciente está infectado por el VHS-1 y/o el VHS-2.

25 La presencia de anticuerpos específicos contra el VHS-1 en el suero de un sujeto permite el cálculo de la probabilidad de que el sujeto fuera seronegativo para el VHS-1 y, por tanto, se podría inferir que una persona es seropositiva para el VHS-1 si su probabilidad de ser seronegativo para el VHS-1 es de menos de un 0,5 %. Los datos que apoyan estos puntos se presentan en la **FIG. 16** (columna más a la derecha), las **FIG. 19-20** (preadsorbido a VHS-2) y la **FIG. 22A**.

La presencia de anticuerpos específicos contra el VHS-2 nos permite calcular la probabilidad de que una persona sea seronegativa para el VHS-2 y, por tanto, podemos inferir que una persona es seropositiva para el VHS-2 si su probabilidad de ser seronegativo para el VHS-2 es de menos de un 0,5 %. Los datos que apoyan estos puntos se presentan en la **FIG. 16** (columna central), las **FIG. 19-20** (preadsorbido a VHS-1) y la **FIG. 22B**.

35 El ensayo ABVIC específico para el tipo combina la (i) prueba de control no infectada, (ii) la prueba de anticuerpos específicos contra el VHS-1 y (iii) la prueba de anticuerpos específicos contra el VHS-2). Los datos que apoyan estos puntos se presentan en las **FIG. 15-18** y las **FIG. 23-24**.

40 El ensayo ABVIC específico para el tipo es altamente cuantitativo y permite la interpretación estadística de la probabilidad de que una persona sea seropositiva para el VHS-1 y/o el VHS-2. Los datos que apoyan estos puntos se presentan en las **FIG. 21-22**.

45 La potencia cuantitativa y estadística de un ensayo ABVIC específico para el tipo permite que la prueba resuelva los resultados de pruebas indeterminados de las pruebas de inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes. Los datos que apoyan estos puntos se presentan en las **FIG. 17, 18, 20 y 22**. Todos los pacientes indeterminados en estudio fueron informados en base a un análisis anterior de inmunoelectrotransferencia para el virus del herpes de que podrían estar infectados por el VHS-2. El suero de  $n = 7$  pacientes indeterminados se analizó en el ensayo ABVIC específico para el tipo (según las **FIG. 21-22**), y los datos brutos de 6 de esos 7 se presentan en las **FIG. 17 y 18** y se resumen estadísticamente para "pacientes 17A- 17C" y "pacientes 18A

- 18C", como sigue:

- VHS-1: La probabilidad de que el paciente 17A sea seronegativo para el VHS-1 es de un 61 %.
- 50 - VHS-2: La probabilidad de que el paciente 17A sea seronegativo para el VHS-2 es de un 79 %.
- Conclusión: El paciente 17A es seronegativo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.
- VHS-1: La probabilidad de que el paciente 17B sea seronegativo para el VHS-1 es de un 77 %.
- VHS-2: La probabilidad de que el paciente 17B sea seronegativo para el VHS-2 es de un 41 %.

- Conclusión: El paciente 17B es seronegativo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.
  - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 17C sea seronegativo para el VHS-1 es de un 3 %.
  - VHS-2: La probabilidad de que el paciente 17C sea seronegativo para el VHS-2 es del 85 %.
  - Conclusión: El paciente 17C es equívoco para el VHS-1 y es seronegativo para el VHS-2.
- 5
- VHS-1: La probabilidad de que el paciente 18A sea seronegativo para el VHS-1 es de un 0,4 %.
  - VHS-2: La probabilidad de que el paciente 18A sea seronegativo para el VHS-2 es de un 45 %.
  - Conclusión: El paciente 18A es débilmente seropositivo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.
  - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 18B sea seronegativo para el VHS-1 es de menos de un 0,01 %.
  - VHS-2: La probabilidad de que el paciente 18B sea seronegativo para el VHS-2 es de un 8 %.
- 10
- Conclusión: El paciente 18B es seropositivo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.
  - VHS-1: La probabilidad de que el paciente 18C sea seronegativo para el VHS-1 es de menos de un 0,01 %.
  - VHS-2: La probabilidad de que el paciente 18C sea seronegativo para el VHS-2 es del 30 %.
  - Conclusión: El paciente 18C es seropositivo para el VHS-1 y seronegativo para el VHS-2.

#### **Desarrollo general**

#### **15 Desarrollo del ensayo ABVIC (unión de anticuerpos a células infectadas por virus) de dos poblaciones celulares**

##### **Introducción**

Existe la necesidad de un indicador de la inmunidad al virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2) que se pueda usar para diferenciar si una vacuna contra el VHS-2 provoca una protección robusta o anémica contra el herpes genital.

- 20 Se ha sugerido que las dificultades pasadas para identificar un indicador clínicamente útil de la inmunidad al VHS-2 se pueden deber a la imposibilidad de identificar el parámetro correcto de la respuesta de los linfocitos T que controla el VHS-2 *in vivo* [Rouse y Kaistha, 2006]. Sin embargo, hay una segunda posibilidad. La mayoría de los intentos de identificar un indicador de la inmunidad al VHS-2 se han centrado en vacunas de subunidades monovalentes (gD-2) o bivalentes (gB-2 + gD-2) que presentan menos de un 3 % del proteoma de
- 25 40 000 aminoácidos del VHS-2 para el sistema inmunitario [Shlapobersky *et al.*, 2012; Bernstein *et al.*, 2010; Bourne *et al.*, 2005; Bernstein, 2005; Bourne *et al.*, 2003; Khodai *et al.*, 2011; Bernstein *et al.*, 2011; Allen *et al.*, 1990; Weir *et al.*, 1989; Kuklin *et al.*, 1997; Manickan *et al.*, 1995; Eo *et al.*, 2001; Natuk *et al.*, 2006; Orr *et al.*, 2007; Karem *et al.*, 1997; Brans y Yao, 2010; Meigner *et al.*, 1988]. Este enfoque no considera el complemento completo de antígenos de VHS-2; al menos 20 proteínas víricas son dianas conocidas de la respuesta de los linfocitos B y T
- 30 humanos al VHS-2 [Hosken *et al.*, 2006; Laing *et al.*, 2010; Gilman *et al.*, 1981]. Por lo tanto, se postuló que se podría identificar más fácilmente un indicador de la inmunidad si: 1) se inmunizaran animales con un inmunógeno polivalente tal como un virus vivo; y/o 2) se midiera la magnitud de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna en términos de la producción de anticuerpos IgG contra todos los antígenos del VHS-2 (IgG de pan-VHS-2).

- 35 El estudio actual se inició para someter a prueba estas predicciones. Se desarrolló un novedoso ensayo basado en citometría de flujo para medir las concentraciones de IgG de pan-VHS-2. Usando este ensayo, se analizaron 117 animales no sometidos previamente a experimentación e inmunizados para comparar las concentraciones séricas antes de la prueba de provocación de IgG pan-VHS-2 con dos medidas de protección contra el VHS-2. Se compararon las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación y la protección contra el VHS-2 en ratones y/o cobayas inmunizados con una vacuna con la subunidad gD-2, VHS-2 natural o uno de varios
- 40 virus VHS-2 ICP0<sup>-</sup> atenuados (0Δ254, 0Δ810, 0ΔRING o 0ΔNLS). Estos seis inmunógenos del VHS-2 provocaron un amplio intervalo de concentraciones de IgG de pan-VHS-2 que abarcan un intervalo de aproximadamente 500 veces. Para 5 de los 6 inmunógenos sometidos a prueba, las concentraciones anteriores a la prueba de provocación de IgG de pan-VHS-2 se correlacionaron cuantitativamente con reducciones de la excreción del virus de la provocación VHS-2 y el aumento de la frecuencia de supervivencia después de la prueba de provocación con VHS-2.
- 45 Conjuntamente, los resultados sugieren que las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 pueden proporcionar una herramienta de cribado sencilla y útil para evaluar el potencial de una vacuna contra el VHS-2 candidata para provocar protección contra el herpes genital por el VHS-2.

##### **Materiales y procedimientos**

**Declaración de ética**

Los ratones y cobayas se manipularon de acuerdo con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Este estudio fue aprobado por el Comité de uso y cuidado de animales de laboratorio de la Facultad de Medicina de la Southern Illinois University y se realizó como se describe en el protocolo aprobado 205-08-019.

**Células y virus**

Se obtuvieron células Vero y células U2OS de la colección americana de cultivos tipo (Manassas, VA), y las células L7 que complementan la ICP0 fueron proporcionadas amablemente por Neal Deluca (Universidad de Pittsburgh; Samaniego *et al.*, 1998). Todas las células se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 5 %, 100 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomycin, en lo sucesivo en el presente documento denominado "DMEM completo". Se propagó VHS-2 MS natural (ATCC) y se tituló en células Vero. Los virus mutantes VHS-2 ICP0<sup>-</sup> usados en este estudio (VHS-2 0Δ810, 0Δ254 y 0ΔRING: Halford *et al.*, 2010) se propagaron en células U2OS y se titularon en células L7 que complementan a ICP0.

**Estudios de provocación con VHS-2**

En el estudio actual (FIG. 2A y 3A) se realizó un análisis retrospectivo del suero obtenido dos años antes. Los detalles de estos estudios se describen en otra parte [Halford *et al.*, 2011; Halford *et al.*, 2010]. Los estudios prospectivos de provocación con vacuna en cobayas se describen en detalle como sigue.

Se obtuvieron cobayas Hartley hembra con un peso promedio de 250 g de Charles River (Wilmington, MA). El día 0, se anestesiaron cobayas mediante administración i.p. de xilazina (5 mg/kg) y ketamina (30 mg/kg), y se inmunizaron por medio de inyección en las almohadillas de la pata trasera derecha de 100 µl que contenía: 1) DMEM completo (no sometidos previamente a experimentación); 2)  $2 \times 10^6$  UFC de VHS-2 0ΔNLS; 3)  $2 \times 10^6$  UFP de VHS-2 MS; o 4) 5 µg de antígeno de glucoproteína D-2 (gD-2) recombinante + 20 µg de monofosforil lípido A (Avanti Polar Biolipids) + adyuvante de alumbre Imject® (Thermo Scientific). El antígeno de gD-2 se expresó a partir de un vector de baculovirus [Nicola *et al.*, 1996] y se ha usado como antígeno de vacuna en numerosos estudios [Bernstein *et al.*, 2010; Bernstein *et al.*, 2011; Halford *et al.*, 2011]. Los detalles de la purificación de esta proteína gD-2 marcada con His se describen en otra parte [Halford *et al.*, 2011]. Las cobayas inmunizadas con VHS-2 MS recibieron 1 mg/ml de aciclovir oral en su agua potable entre los días 0 y 20 después de la inmunización para limitar la patogenia vírica; el 100 % de las cobayas sobrevivieron a su exposición primaria al VHS-2 MS sin desarrollar signos evidentes de enfermedad. Las cobayas recibieron una inmunización equivalente en sus almohadilla trasera izquierda el día 30 (según el diseño mostrado en la FIG. 4A). No se trató con aciclovir a las cobayas inmunizadas con el VHS-2 MS en el momento de la segunda inmunización de refuerzo. Se extrajo sangre de las cobayas el día 75 después de la inmunización mediante punción de la vena safena con una aguja de 25 G y se recogió sangre con un tubo heparinizado de extracción de sangre Natelson. La fracción de suero se recogió y conservó a -80 °C.

Se sometió a prueba de provocación con VHS-2 MS a todas las cobayas el día 90, como sigue. Antes de la inoculación vírica, se anestesiaron cobayas mediante administración i.p. de xilazina (5 mg/kg) y ketamina (30 mg/kg). Se provocó vaginalmente a cobayas no sometidas previamente a experimentación e inmunizadas con VHS-2 MS natural: 1) limpiando en primer lugar el tapón de moco de la vagina con una torunda de algodón; 2) girando una segunda torunda de algodón dentro de la cúpula vaginal para secar aún más las paredes de la vagina; y 3) instilando en la cúpula vaginal 40 µl de DMEM completo que contenía  $2 \times 10^6$  UFP de VHS-2 MS.

Los títulos víricos en la cúpula vaginal de cobayas sometidas a prueba de provocación se determinaron 8 horas después de la prueba de provocación (fase de eclipse) y en los días 1, 2, 3, 4, 6 y 8 después de la prueba de provocación insertando y girando una torunda en la cúpula vaginal de las cobayas, y transfiriendo la punta a 0,4 ml de DMEM completo. Los títulos víricos se determinaron como se describe anteriormente. Se monitorizaron las cobayas diariamente y los animales que presentaron una ulceración perivaginal grave se sacrificaron lo antes posible. La región perivaginal de todas las cobayas se fotografió en el día 7 después de la prueba de provocación. Las cobayas supervivientes se sacrificaron el día 30 después de la prueba de provocación.

**Transferencia adoptiva de suero con anticuerpos contra el VHS-2 a ratones de la línea consanguínea 129**

Se obtuvieron ratones hembra de la línea 129 a las 6 a 8 semanas de edad de Charles River (Wilmington, MA). Los días 0 y 30, se anestesiaron  $n = 10$  ratones mediante administración i.p. de xilazina (7 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg), y se inmunizaron por medio inyección en las almohadillas de las patas traseras derecha e izquierda, respectivamente, de 50 µl que contenían  $10^6$  UFP de VHS-2 0ΔNLS. El día 85, se sacrificaron  $n = 5$  ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS para recoger el suero con anticuerpos contra el VHS-2, y se sacrificaron  $n = 5$  ratones no sometidos previamente a experimentación emparejados por la edad, para recoger suero no sometido previamente a experimentación. El día 90, los ratones no sometidos previamente a experimentación recibieron una transferencia adoptiva de 0,25 ml de una mezcla de sueros con anticuerpos contra el VHS-2 o una mezcla de sueros no sometidos previamente a experimentación de 0,25 ml. Inmediatamente después de la transferencia adoptiva, se anestesiaron estos  $n = 10$  ratones no sometidos previamente a experimentación mediante administración i.p. de xilazina (7 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg), y se sometieron a una prueba de provocación con 100 000 UFP por ojo

de VHS-2 MS. Del mismo modo, al mismo tiempo se anestesiaron  $n = 5$  ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS (en los días 0 y 30) y se sometieron a una prueba de provocación con 100 000 UFP por ojo de VHS-2 MS. La excreción de VHS-2 MS se monitorizó en estos ratones como se describe en otra parte [Halford *et al.*, 2011].

#### **ELISA de captura de anticuerpos para enumerar las concentraciones de anticuerpos IgG de pan-VHS-2 en suero**

- 5 Placas de 96 pocillos de EIA de alta unión (Costar, Corning, NY) se recubrieron durante la noche (aproximadamente 18 horas) a 4 °C con 100 μl por pocillo de tampón de carbonato de sodio (pH 9,6) que contenía 0,2 μg por ml de antígenos de VHS-2 totales. Se aisló el antígeno total de VHS-2 de las células Vero infectadas por el VHS-2 como sigue: se inocularon cinco placas de 100 mm de células Vero (8 millones de células por placa) con 3 UFP por célula de VHS-2 MS y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Se aspiró medio de cultivo desde las placas, se enjuagaron las células con 5 ml de PBS por placa y se recubrieron las células con 2 ml de tampón de carbonato de sodio (pH 9,6) por placa y se congelaron a -80 °C. Se descongelaron los lisados celulares de VHS-2 y se clarificaron mediante centrifugación a baja velocidad para retirar los residuos celulares. El sobrenadante clarificado tenía una concentración de proteína de 10 μg/ml y se congeló en alícuotas de 0,2 ml. Por cada placa de 96 pocillos que se iba a recubrir con antígeno de VHS-2, se diluyó 1:50 (0,2 μg por ml) una alícuota única de antígeno total de VHS-2 y se usó para recubrir una placa de EIA de alta unión. Después del recubrimiento durante la noche (aproximadamente 18 horas) con antígeno total de VHS-2, se bloquearon los pocillos durante 2 horas con 400 μl de leche en polvo al 2 % disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) + Tween-20 al 0,02 % (polioxietileno-20-monolaurato de sorbitano), en lo sucesivo en el presente documento denominado tampón PBS-T.
- 10
- 15
- 20 Cada muestra de suero que se iba a someter a prueba se diluyó 2,5:250 en PBS + suero fetal bovino al 1 % + Tween-20 al 0,02 %. Después de descartar el tampón de bloqueo de las placas ELISA, se añadieron muestras de 100 μl de suero diluido a los pocillos recubiertos con antígeno de VHS-2 total y se incubaron durante 2 horas.

- Las placas de ELISA se enjuagaron tres veces con un exceso de tampón PBS-T antes de la adición de 100 μl de anticuerpo secundario diluido 1:1500 en tampón PBS-T; el anticuerpo secundario era fragmento Fc de anticuerpo caprino contra IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA). Después de dejar transcurrir 1 hora, el anticuerpo secundario se enjuagó de las placas siete veces con tampón PBS-T, y se añadieron 200 μl de sustrato de fosfato de *p*-nitrofenilo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a cada pocillo y se midió el desarrollo colorimétrico ( $DO_{405}$ ) después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. La relación cuantitativa entre la abundancia de log (IgG de pan-VHS-2) ( $x$ ) y  $DO_{405}$  ( $y$ ) se definió usando una serie de dilución de 0,33 log de suero con anticuerpos contra el VHS-2 y una curva estándar basada en la tangente hiperbólica (FIG. 9A). La abundancia de log (IgG de pan-VHS-2) en cada muestra de suero se derivó de los valores de  $DO_{405}$  usando una ecuación de arcotangente hiperbólica recíproca de la forma  $x = x_{50} + \Delta X \cdot \arctan\left(\frac{DO_{405} - y_{50}}{\Delta Y}\right)$ , como se describe en otra parte [Halford *et al.*, 2010; Halford *et al.*, 2005a].
- 25
- 30

#### **Ensayo de citometría de flujo para enumerar las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en suero de ratón y cobaya**

- 35 Se generaron suspensiones de células sueltas de una mezcla de células VHS-2<sup>+</sup> y células no infectadas (NI), como sigue. Se sembraron doce placas de 100 mm con  $7 \times 10^6$  células Vero por placa en DMEM completo y se inocularon seis placas 6 horas después con 3 UFP por célula de VHS-2 MS. Las células Vero VHS-2<sup>+</sup> se recogieron 12 horas después de la inoculación y las células Vero NI se recogieron en paralelo al mismo tiempo.
- 40 Ambas poblaciones celulares se dispersaron aspirando medio de cultivo, enjuagando cada placa con 5 ml de PBS y añadiendo 2 ml de PBS + ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM pH 8,0. Cabe destacar que PBS + EDTA 5 mM fue suficiente para provocar que las células Vero se levantasen y se separasen la una de la otra sin el uso de tripsina. En el caso de las células VHS-2<sup>+</sup>, la solución de PBS + EDTA 5 mM se complementó con carboxifluoresceína diacetato, succinimidil éster 1 μM (CFSE; Anaspec, Fremont, CA) para marcar las células VHS-2<sup>+</sup> con un fluoróforo verde.
- 45 Se incubaron células a temperatura ambiente en una plataforma oscilante durante 10 minutos hasta que las células comenzaron a levantarse y, a continuación, se dispersaron por trituración con la ayuda de un pipeteador P-1000. Todas las células NI dispersas se colocaron en un único cónico de 50 ml y todas las células VHS-2<sup>+</sup> dispersas se colocaron en un segundo cónico de 50 ml, y ambos se centrifugaron a 200 × g durante 5 minutos para sedimentar las células. Se decantaron los sobrenadantes, se resuspendieron los sedimentos celulares en 12 ml de PBS y se le añadió un volumen igual de fijador 2x (formaldehído al 7,4 % + sacarosa al 4 %).
- 50 Se incubaron las células en fijador 1x durante 20 minutos, se centrifugaron y se resuspendieron en 24 ml de metanol al 90 % para permeabilizar las células. Después de una incubación de 10 minutos, se centrifugaron las células, se resuspendieron en PBS + suero fetal bovino al 3 % (PBS-F) y se retiraron los agregados de células mediante el paso a través de un filtro celular de malla de nailon de 40 μm (BD Biosciences, San Jose, CA), seguido por el paso a través de una aguja de calibre 25.
- 55

Se determinó la densidad celular en suspensiones de células aisladas de células Vero NI y células VHS-2<sup>+</sup> marcadas con CFSE, y las células NI y las células VHS-2<sup>+</sup> se combinaron en una relación aproximada de 2:1. Se centrifugaron las células, se resuspendieron a una concentración de  $1,25 \times 10^6$  células por ml en solución de bloqueo de PBS-F-Ig (es decir, PBS-F complementado con 20 µg/ml de  $\gamma$ -globulina de burro,  $\gamma$ -globulina de cabra y  $\gamma$ -globulina humana; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA).

Se colocaron alícuotas de células NI y VHS-2<sup>+</sup> (400 µl; 500 000 células) en tubos de microcentrifuga de 1,7 ml, y se le añadió 2 µl de suero diluido 1:30 a cada suspensión celular para lograr una dilución sérica neta de 1:6000. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante cuatro horas en un rotador de hibridación Rotisserie LabQuake® para mantener las células en suspensión por rotación (Barnstead International, Dubuque, IA) y se retiró el anticuerpo primario mediante dos enjuagues con 1,25 ml de PBS-F secuenciales, donde se usó una centrifuga de cubeta oscilante para sedimentar las células y se aspiró el sobrenadante de enjuague.

Para enumerar la cantidad de anticuerpo IgG unido a células VHS-2<sup>+</sup> frente a NI, se incubaron las células con una dilución 1:1000 de fragmento Fc de anticuerpo caprino contra IgG de ratón conjugado con APC o anticuerpo de burro contra IgG de cobaya conjugado con APC (H + L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Después de una incubación de 1 hora, se retiró el exceso de anticuerpo secundario mediante tres enjuagues con 1,25 ml de PBS-F secuenciales.

Se resuspendieron las células en un volumen total de 0,2 ml de PBS-F y se analizaron mediante citometría de flujo de dos colores en los canales FL1 y FL4 de un citómetro de flujo Accuri™ C6 usando el programa informático CFlow (Accuri Cytometers, Inc., Ann Arbor, MI). En promedio, se registraron 125 000 eventos por muestra; específicamente, el citómetro de flujo se configuró para registrar eventos hasta que estuvieran incluidas 25 000 células VHS-2<sup>+</sup> individuales en el conjunto de datos. Se calcularon las concentraciones de Ig de pan-VHS-2 en cada muestra de suero en base a la diferencia en la media de la intensidad de fluorescencia ( $\Delta$ MFI) de 25 000 células VHS-2<sup>+</sup> frente a ~50 000 células NI (**FIG. 1**). La fluorescencia de fondo se definió como el valor promedio de  $\Delta$ MFI observado en suspensiones celulares incubadas con suero no sometido previamente a experimentación.

## **Análisis matemático y estadístico de resultados**

A menos que se especifique de otro modo, todos los valores presentados son la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de muestras duplicadas. Los títulos víricos se determinaron mediante un ensayo en placas de microtitulación y se analizaron estadísticamente en una escala logarítmica (por ejemplo,  $\log$  [UFP/vagina]). El virus infeccioso no fue detectable en algunas torundas oculares o vaginales de animales bien inmunizados. En dichos eventos, a la muestra se le asignó un valor de 8 UFP por torunda (es decir, el límite inferior de detección del ensayo), de modo que todas las muestras se pudieran analizar en una escala logarítmica. La significación de las diferencias en las comparaciones de grupos múltiples se comparó mediante un análisis de varianza (ANOVA) unilateral seguido de una prueba de la *t* de Tukey *a posteriori* usando el programa informático GraphPad InStat™ v3.10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). La significación de la diferencia entre dos grupos se realizó usando la función "prueba de la *t* suponiendo varianzas iguales" de Microsoft Excel. La significación de las diferencias en la frecuencia de supervivencia se determinó mediante la prueba exacta de Fisher utilizando un programa informático en línea disponible gratuitamente (Preacher y Briggs, 2001).

Todos los datos se analizaron estadísticamente usando valores logarítmicos. Se realizó un análisis de regresión lineal mediante el procedimiento de mínimos cuadrados usando la función de análisis de "regresión" en Microsoft Excel, y se usó para calcular la bondad de ajuste (valor  $r^2$ ) y la probabilidad (*p*) de que la variable y no cambiara como una función de la variable *x*.

Los valores del coeficiente de varianza de los que se informa en la FIG. 6 se calcularon para cada dilución de suero con anticuerpos contra el VHS-2 mediante la fórmula,  $100 \times$  (desviación estándar de muestras por triplicado  $\div$  media de muestras por triplicado). Los valores de los que se informa en la **FIG. 6** representan la media  $\pm$  EEM del coeficiente de varianza para todas las diluciones de suero con anticuerpos contra el VHS-2 en el intervalo lineal del ensayo (es decir, 1:21-1:1000 diluciones para el ensayo de neutralización; 1:100-1:100 000 diluciones para el ELISA de captura de anticuerpos y 1:6000-1:6 000 000 diluciones para el ensayo de citometría de flujo).

## **Resultados**

### **Un ensayo basado en citometría de flujo para medir las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2**

La presencia de anticuerpos IgG en suero que se unen a los antígenos de VHS-2 totales (IgG de pan-VHS-2) se puede analizar cualitativamente mediante tinción inmunofluorescente de placas de VHS-2 en monocapas de células Vero fijadas (**FIG. 1A** y **1B**). Se desarrolló una variante más cuantitativa, basada en citometría de flujo, de este ensayo. Se obtuvieron suspensiones de células sueltas de células Vero infectadas por el VHS-2 (VHS-2<sup>+</sup>) y no infectadas (NI) dispersando monocapas de cultivo, fijando y permeabilizando células, y filtrando a través de una malla de 40 µm y una aguja de 25 g para retirar los agregados celulares. Para permitir la tinción de los anticuerpos de células VHS-2<sup>+</sup> frente a NI en una sola reacción, las células VHS-2<sup>+</sup> se marcaron con el fluoróforo verde carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE).

Se incubaron suspensiones de aproximadamente un 30 % de células VHS-2<sup>+</sup> y aproximadamente un 70 % de células NI con suero de ratones no sometidos previamente a experimentación o de ratones inmunizados con VHS-2, y se marcaron de forma fluorescente con alofocianina (APC)-anticuerpo secundario contra fragmento Fc de IgG de ratón. Se analizaron las células marcadas con anticuerpo mediante citometría de flujo de 2 colores (FIG. 1C y 1D).

5 Cuando se incubaron las suspensiones celulares con una dilución 1:6000 de suero de ratón no sometido previamente a experimentación, concentraciones similares de anticuerpo IgG se unieron a células VHS-2<sup>+</sup> y células NI (VHS<sub>MFI</sub> = 6510; NI<sub>MFI</sub> = 7970; FIG. 1C). Por el contrario, cuando se incubaron las suspensiones celulares con una dilución 1:6000 de suero con anticuerpos contra el VHS-2, la concentración de anticuerpo unido a células VHS-2<sup>+</sup> fue mucho más alta que a células NI (VHS<sub>MFI</sub> = 608, 180; NI<sub>MFI</sub> = 29, 420; FIG. 1D).

10 Las concentraciones en suero de ratón del anticuerpo "IgG contra pan-VHS-2" se estimaron en base a la diferencia en la media de la intensidad de fluorescencia ( $\Delta$ MFI) entre las células VHS-2<sup>+</sup> y las células NI. El valor de  $\Delta$ MFI resultante asociado con cada muestra de suero se normalizó a un "factor de aumento por encima del fondo" mediante el siguiente cálculo:  $\Delta$ MFI<sub>muestra problema</sub>  $\div$   $\Delta$ MFI<sub>sueros no sometidos previamente a experimentación promedio</sub>. Cuando se aplicó este enfoque, se estimó que los sueros de  $n = 6$  ratones no sometidos previamente a experimentación poseían concentraciones de IgG de pan-VHS-2 que eran  $1,0 \pm 0,2$  veces el fondo (FIG. 1E). Por el contrario,  $n = 6$  ratones inmunizados con un virus VHS-2  $\Delta$ NLS vivo atenuado [Halford *et al.*, 2011] poseían concentraciones de IgG de pan-VHS-2 que tenían  $940 \pm 240$  veces el fondo (FIG. 1E). Por lo tanto, la citometría de flujo de células VHS-2<sup>+</sup> teñidas con anticuerpos frente a NI proporcionó un medio potencial para medir la abundancia de IgG de pan-VHS-2 en el suero de animales vacunados.

#### 20 Comparación de procedimientos para enumerar las concentraciones séricas de anticuerpos específicos contra el VHS-2

Las mediciones basadas en citometría de flujo de la abundancia de IgG de pan-VHS-2 se compararon con dos ensayos más tradicionales; a saber, un ensayo de neutralización de VHS-2 y un ELISA de captura de anticuerpos. Para esta comparación, se construyó una serie de dilución de suero con anticuerpos diluyendo suero de ratón con anticuerpos contra el VHS-2 en suero no sometido previamente a experimentación en incrementos de 0,33 log que abarcan un intervalo de 4640 veces. El uso de suero de ratón no sometido previamente a experimentación como diluyente garantizó que la concentración de proteína sérica (por ejemplo, IgG) permaneciera constante, mientras que los anticuerpos específicos contra el VHS-2 se diluyeron selectivamente en incrementos de 0,33 log.

30 El suero con anticuerpos contra el VHS-2 neutralizó la infecciosidad del VHS-2 entre diluciones 1:21 y 1:1000, y presentó poca o ninguna actividad neutralizante a diluciones de 1:2150 o mayores (FIG. 8A). Por tanto, el intervalo dinámico del ensayo de neutralización de VHS-2 fue de 1:21 a 1:1000, y el coeficiente de variación de las mediciones fue de  $16 \pm 8$  % dentro de este intervalo (FIG. 6).

35 La abundancia de anticuerpos contra el VHS-2 en la serie de dilución de suero con anticuerpos se evaluó mediante ELISA de captura de anticuerpos usando lisados de células Vero infectadas por el VHS-2 como antígeno de recubrimiento. El ELISA de captura de anticuerpos proporcionó una conversión significativa del sustrato de par-nitrofenilfosfato (DO<sub>405</sub>) a diluciones de suero entre 1:100 y 1:100 000 (FIG. 8B). En este intervalo lineal, el coeficiente de variación de la medición basada en ELISA de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 fue de  $13 \pm 3$  % (FIG. 6).

40 La abundancia de anticuerpos contra el VHS-2 en la serie de dilución de suero con anticuerpos se evaluó mediante un novedoso ensayo basado en citometría de flujo (FIG. 1). La citometría de flujo de células problema teñidas con suero proporcionó una  $\Delta$ MFI significativa de la unión de anticuerpo IgG a células VHS-2<sup>+</sup> frente a células NI entre diluciones 1:6000 y 1:6 000 000 de suero con anticuerpos (FIG. 8C). En este intervalo lineal, el coeficiente de variación de las mediciones basadas en ELISA de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 fue de  $5 \pm 1$  % (FIG. 6).

45 Los tres ensayos proporcionaron estimaciones paralelas de la abundancia del anticuerpo contra pan-VHS-2, pero el ensayo basado en citometría de flujo fue el más sensible. Específicamente, el ensayo de flujo tuvo un límite de detección más bajo de 1:6 000 000 con respecto al suero con anticuerpos contra VHS-2, mientras que el ensayo de neutralización de VHS-2 y el ELISA de captura de anticuerpos tuvieron límites más bajos de 1:2100 y 1:100 000, respectivamente (FIG. 6). Además, el ensayo basado en citometría de flujo fue el más preciso y presentó un coeficiente de variación de 2 a 3 veces menor con respecto a los otros ensayos (FIG. 6). Finalmente, el ensayo basado en citometría de flujo fue único en que la métrica primaria, LA  $\Delta$ MFI, representó el promedio de unión del anticuerpo IgG a 25 000 células VHS-2<sup>+</sup> frente a aproximadamente 50 000 células de control de fondo. Esta extensa replicación en mediciones explica la mayor precisión del procedimiento basado en citometría de flujo.

#### 55 La IgG de pan-VHS-2 se correlaciona con la protección frente a la provocación ocular con el VHS-2 en ratones

Se realizó un análisis retrospectivo en  $n = 48$  muestras de suero derivadas de ratones usados en un experimento de provocación ocular con el VHS-2 publicado previamente (figuras 5 y 6 en Halford *et al.*, 2010). El objetivo de este análisis fue determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en sueros archivados variaban en proporción a la protección observada en ratones con provocación ocular con VHS-2.

Se revisa el diseño del experimento original. Cinco de 6 grupos de ratones se inocularon en el ojo derecho con medio de cultivo (controles no sometidos previamente a experimentación) o 100 000 UFP por ojo derecho de los virus mutantes VHS-2 ICP0- VHS-2 0ΔNLS, 0Δ810, 0Δ254 o 0ΔRING (FIG. 2A). Un sexto grupo se inoculó de forma similar con VHS-2 MS natural, pero la patogenia de la infección se restringió tratando a los ratones con aciclovir (FIG. 2A). Se extrajo sangre el día 60 y se sometió a los ratones a una prueba de provocación el día 70 con 100 000 UFP por ojo izquierdo de VHS-2 MS (FIG. 2A). Se pasó una torunda en los ojos izquierdos de estos ratones diariamente entre los días 1 y 3 después de la prueba de provocación para monitorizar la replicación vírica, y se observó la aparición de enfermedad durante un período de 30 días (FIG. 2A).

Se determinaron las concentraciones anteriores a la prueba de provocación de IgG de pan-VHS-2 en los grupos de inmunización y se ordenaron por rango (FIG. 2B). Los ratones inmunizados con los virus VHS-2 0Δ810, 0Δ254 o 0ΔRING poseían concentraciones bajas a intermedias de IgG de pan-VHS-2 que estaban un promedio de 5 a 23 veces por encima del fondo (FIG. 2B). Por el contrario, los ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS o VHS-2 MS restringido con aciclovir poseían concentraciones de IgG de pan-VHS-2 que estaban un promedio de 110 y 290 veces por encima del fondo, respectivamente (FIG. 2B).

Se aplicó un análisis de regresión para determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación se correlacionaban con una reducción de la excreción del VHS-2 después de la provocación ocular. La hipótesis nula pronosticaba que el modelo de regresión lineal de mejor ajuste ( $y = b + mx$ ) para estos 48 pares de datos emparejados tendría una pendiente (m) de 0 (FIG. 2C). La probabilidad de que esta hipótesis nula fuera correcta fue  $p < 10^{-11}$ . Más bien, la excreción del virus de la provocación VHS-2 (variable y) disminuyó un promedio de 0,56 logaritmos por cada 1 logaritmo que aumentaron las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 (variable x) (línea negra en la FIG. 2C).

El valor de bondad de ajuste ( $r^2$ ) para el modelo de regresión lineal de mejor ajuste fue de 0,65, lo que reflejaba el hecho de que el nivel observado de excreción del VHS-2 en muchos ratones no se ajustaba perfectamente a la cantidad pronosticada por la ecuación  $y = 3,35 - 0,56x$  (línea negra en la FIG. 2C). Sin embargo, el nivel promedio de excreción del VHS-2 ocular disminuyó en proporción directa a las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en 5 de 6 grupos de inmunización, dentro del error estándar de las mediciones (FIG. 2D;  $r^2 = 0,86$ ). La excepción a esta tendencia fue la de ratones inmunizados con el virus VHS-2 0Δ254, que provocó una protección muy variable contra el VHS-2 y, por tanto, se eliminó rápidamente de la consideración como una vacuna viva candidata viable contra el VHS-2 [Halford *et al.*, 2010].

La frecuencia con la que los ratones inmunizados sobrevivieron a la prueba de provocación ocular con el VHS-2 se representó gráficamente como una función de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación (FIG. 2E). Los ratones no sometidos previamente a experimentación tenían concentraciones indetectables de IgG de pan-VHS-2 y ninguno sobrevivió a la prueba de provocación con el VHS-2 (FIG. 2E). Los ratones inmunizados con VHS-2 0Δ810 o VHS-2 0Δ254 tuvieron las concentraciones más bajas de IgG de pan-VHS-2, y solo 3 de 8 (43 %) por grupo sobrevivieron a la provocación con el VHS-2 (FIG. 2E). Los ratones inmunizados con VHS-2 0ΔRING tenían concentraciones intermedias de IgG de pan-VHS-2, y 5 de 8 sobrevivieron a la provocación con el VHS-2 (FIG. 2E). Los ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS o MS restringido con aciclovir tuvieron las concentraciones más altas antes de la prueba de provocación de IgG de pan-VHS-2, y el 100 % sobrevivió a la prueba de provocación ocular con el VHS-2 (FIG. 2E). Conjuntamente, estos resultados indicaron que las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación se correlacionaban con la protección inducida por la vacuna frente al VHS-2 en términos de: 1) reducción de la excreción ocular del virus de la provocación VHS-2; y 2) aumento de la frecuencia de supervivencia.

#### **Estimaciones con ELISA frente a citometría de flujo de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2**

Se realizó una prueba para determinar si la medición por citometría de flujo de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 ofrecía alguna ventaja práctica con respecto a ELISA de captura de anticuerpos. Con este fin, las mismas muestras de suero de ratón consideradas anteriormente se volvieron a analizar mediante ELISA de captura de anticuerpos usando lisados celulares infectados por el VHS-2 como antígeno de recubrimiento. Se utilizó una serie de dilución de 0,33 log del suero con anticuerpo contra el VHS-2 para definir con precisión la relación sigmoidea entre los valores de absorbancia  $DO_{405}$  y las concentraciones de log (IgG de pan-VHS-2) usando una ecuación de tangente hiperbólica (FIG. 9A;  $r^2 = 1,00$ ). Se derivaron matemáticamente estimaciones de las concentraciones de log (IgG de pan-VHS-2) para cada muestra de suero ajustando los valores de absorbancia  $DO_{405}$  de cada muestra de suero a esta curva estándar.

Las estimaciones basadas en ELISA de log (IgG de pan-VHS-2) se correlacionaron con una disminución de la excreción del VHS-2 ocular (línea negra en la FIG. 9B;  $r^2 = 0,54$ ). Sin embargo, la bondad de ajuste de las estimaciones mediante ELISA de IgG de pan-VHS-2 fue menos robusta que la correlación equivalente con estimaciones mediante citometría de flujo de IgG de pan-VHS-2 (FIG. 2C;  $r^2 = 0,65$ ). En parte, esto se debió a la varianza 2,5 veces mayor de las estimaciones basadas en ELISA frente a citometría de flujo de IgG de pan-VHS-2 (FIG. 6).

La sensibilidad relativa de las estimaciones mediante ELISA frente a citometría de flujo de IgG de pan-VHS-2 se analizó gráficamente. Se representaron en el eje de abscisas las estimaciones mediante ELISA de log IgG (pan-VHS-2), mientras que las estimaciones mediante citometría de flujo correspondientes se representaron en el eje de ordenadas (**FIG. 9C**). Si las estimaciones mediante ELISA frente a citometría de flujo eran igualmente sensibles, entonces estos  $n = 48$  puntos de datos se debían dispersar gráficamente alrededor de una línea de equivalencia '0 log' (**FIG. 9C**). Sin embargo, 35 de las 36 muestras seropositivas cayeron por encima de la línea de equivalencia, lo que sugiere que la citometría de flujo proporcionaba estimaciones más altas de log (IgG de pan-VHS-2) que ELISA. En 6 de las 36 muestras seropositivas, la citometría de flujo proporcionó una estimación de más de +1 log más alta de IgG de pan-VHS-2 con respecto a ELISA (**FIG. 9C**). En estas  $n = 36$  muestras seropositivas, la citometría de flujo proporcionó una estimación promedio de  $5 \pm 1$  veces más alta del nivel de IgG de pan-VHS-2 con respecto a ELISA. En los dos extremos de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2, los puntos de datos se agruparon cerca de la línea de equivalencia (**FIG. 9C**). Sin embargo, en el intervalo de sensibilidad de bajo a medio, el ensayo de citometría de flujo fue más sensible que ELISA ( $p < 0,01$  para VHS-2 0ΔNLS, 0Δ810, 0Δ254 o 0ΔRING; prueba de la  $t$  pareada). En base a este y análisis anteriores (**FIG. 6**), se llegó a la conclusión de que la citometría de flujo y ELISA proporcionaban estimaciones paralelas de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2, pero el procedimiento de citometría de flujo ofrecía una precisión y sensibilidad mejoradas.

### La IgG de pan-VHS-2 se correlaciona con la protección frente a la provocación vaginal con el VHS-2 en ratones

Se realizó un segundo análisis retrospectivo en suero de ratón derivado de un experimento publicado previamente (figura 4 en Halford *et al.*, 2011). El objetivo de este análisis fue determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en sueros archivados variaban en proporción a la protección observada en ratones con provocación vaginal con VHS-2.

Se revisa el diseño del experimento original. Se inmunizaron ratones los días 0 y 30 en las patas traseras derecha e izquierda, respectivamente, con: 1) medio de cultivo (controles no sometidos previamente a experimentación); 2) 2,5 μg de proteína verde fluorescente (GFP) con alumbre y 10 μg de MPL como adyuvante; 3) 2,5 μg de gD-2<sub>306t</sub> [Nicola *et al.*, 1996] con alumbre y 10 μg de MPL como adyuvante; 4) 10<sup>6</sup> UFP de VHS-2 0ΔNLS; o 5) 10<sup>6</sup> UFP de VHS-2 MS natural donde se usó aciclovir para limitar la patogenia de la exposición primaria a MS (**FIG. 3A**;  $n = 10$  por grupo). Se extrajo sangre el día 60 y se sometió a los ratones a prueba de provocación los días 90 o 100 con 500 000 UFP por vagina de VHS-2 MS. Se pasó una torunda a todos los  $n = 50$  ratones entre los días 1 y 7 después de la prueba de provocación para medir la excreción del VHS-2 vaginal y se observó la aparición de enfermedad durante un período de 30 días (**FIG. 3A**).

Se determinaron las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en los grupos de inmunización y se ordenaron por rango (FIG. 3B). Los ratones no sometidos previamente a experimentación e inmunizados con GFP no poseían IgG de pan-VHS-2 detectable, y ninguno de estos ratones sobrevivió a la prueba de provocación vaginal con VHS-2 (**FIG. 3B**). Los ratones inmunizados con gD-2 poseían IgG de pan-VHS-2 que era un promedio de 10 veces por encima del fondo, y 1 de cada 10 sobrevivió a la prueba de provocación vaginal con el VHS-2 (**FIG. 3B**). Es importante destacar que los títulos de anti-gD-2 en ratones inmunizados con gD-2 fueron de ~200 000 (figura 3C de Halford *et al.*, 2011), que es similar a otros estudios publicados [Bernstein *et al.*, 2010; Bourne *et al.*, 2005; Bourne *et al.*, 2003]. Los ratones inmunizados con los virus VHS-2 vivos MS o 0ΔNLS poseían concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación que estaban un promedio de 390 y 650 veces por encima del fondo, respectivamente; el 100 % de estos ratones sobrevivieron a la prueba de provocación vaginal con VHS-2 sin síntomas visibles de enfermedad (**FIG. 3B**).

Se aplicó un análisis de regresión para determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación se correlacionaban con una reducción de la excreción del VHS-2 después de la provocación vaginal. La hipótesis nula pronosticaba que el modelo de regresión lineal de mejor ajuste para estos 50 pares de datos emparejados tendría una pendiente (m) de 0 (**FIG. 3C**). La probabilidad de que esta hipótesis nula fuera correcta fue  $p < 10^{-14}$ . Más bien, la excreción del virus de la provocación VHS-2 (y) disminuyó un promedio de 0,76 logaritmos por cada 1 logaritmo que aumentaron las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 (x) (línea negra en la **FIG. 3C**). La bondad de ajuste ( $r^2$ ) para esta línea de regresión fue de 0,73, lo que reflejaba el hecho de que el nivel observado de excreción del VHS-2 en muchos ratones no se ajustaba perfectamente a la cantidad pronosticada por la ecuación  $y = 3,85 - 0,76x$  (línea negra en la **FIG. 3C**). Sin embargo, el nivel promedio de excreción del VHS-2 vaginal disminuyó en proporción directa a las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en los 5 grupos de inmunización, dentro del error estándar de las mediciones (**FIG. 3D**;  $r^2 = 0,98$ ). Por lo tanto, las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación se correlacionaron con la protección inducida por la vacuna contra el VHS-2 en ratones en términos de: 1) reducción de la excreción vaginal del virus de la provocación VHS-2; y 2) aumento de la frecuencia de supervivencia.

### La IgG de pan-VHS-2 se correlaciona con la protección frente a la provocación vaginal con el VHS-2 en cobayas

Se realizó un tercer análisis prospectivo para determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación variaban en proporción a la protección frente al VHS-2 en una especie distinta de los ratones.

Para abordar esta cuestión, se inmunizaron grupos de  $n = 5$  cobayas en los días 0 y 30 en las patas traseras derecha e izquierda, respectivamente, con: 1) medio de cultivo (no sometidos previamente a experimentación); 2) 5  $\mu\text{g}$  de gD-2 con alumbre y 20  $\mu\text{g}$  de MPL como adyuvante; 3)  $2 \times 10^6$  UFP de VHS-2 0 $\Delta$ NLS; o 4)  $2 \times 10^6$  UFC de VHS-2 MS natural donde se usó aciclovir para restringir la patogenia de la exposición primaria a MS (**FIG. 4A**). Se extrajo sangre de las cobayas el día 75 y se sometieron a la prueba de provocación el día 90 con  $2 \times 10^6$  UFP de VHS-2 MS por vagina (**FIG. 4A**). Desafortunadamente, se perdió una cobaya inmunizada con gD-2 por una sobredosis de anestesia; por tanto, solo  $n = 4$  de cobayas inmunizadas con gD-2 estaban disponibles después de la prueba de provocación vaginal con VHS-2. Las cobayas no sometidas previamente a experimentación excretaron títulos máximos de aproximadamente 200 000 UFP por vagina el día 2 después de la prueba de provocación (**FIG. 4B**). Las cobayas inmunizadas con gD-2 excretaron un promedio de 5 veces menos VHS-2 con respecto a las cobayas no sometidas previamente a experimentación entre los días 1 y 8 después de la prueba de provocación (**FIG. 4B**). Por el contrario, las cobayas inmunizadas con VHS-2 MS o 0 $\Delta$ NLS excretaron un promedio de 150 y 200 veces menos de VHS-2, respectivamente, con respecto a las cobayas no sometidas previamente a experimentación (**FIG. 4B**).

Se aplicó un análisis de regresión para determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación en cobayas se correlacionaban con una reducción de la excreción del VHS-2 después de la provocación vaginal. La hipótesis nula pronosticaba que el modelo de regresión lineal de mejor ajuste para estos  $n = 19$  pares de datos emparejados tendría una pendiente (m) de 0 (**FIG. 4C**). La probabilidad de que esta hipótesis nula fuera correcta fue  $p < 10^{-7}$ . Más bien, la excreción del virus de la provocación VHS-2 (y) disminuyó un promedio de 0,95 logaritmos por cada 1 logaritmo que aumentaron las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 (x) (línea negra en la **FIG. 4C**). La bondad de ajuste ( $r^2$ ) para esta línea de regresión fue de 0,85, lo que reflejaba el hecho de que el nivel observado de excreción del VHS-2 en muchas cobayas no se ajustaba perfectamente a la cantidad pronosticada por la ecuación  $y = 3,77 - 0,95x$  (**FIG. 4C**). Sin embargo, el nivel promedio de excreción del VHS-2 vaginal disminuyó en proporción directa a las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en los cuatro grupos de inmunización, dentro del error estándar de las mediciones (**FIG. 4D**;  $r^2 = 0,98$ ).

Con respecto a la progresión de la enfermedad, las cobayas no sometidas previamente a experimentación desarrollaron uniformemente enfermedad perivaginal florida y tuvieron que ser sacrificados el día 11 después de la prueba de provocación o antes (**FIG. 4E**). Las cobayas inmunizadas con gD-2 poseían concentraciones bajas de IgG de pan-VHS-2 y tres de cuatro desarrollaron enfermedad perivaginal florida que requirió su sacrificio el día 11 después de la prueba de provocación o antes (**FIG. 4E**). Por el contrario, las cobayas inmunizadas con los virus VHS-2 MS o 0 $\Delta$ NLS vivos poseían concentraciones altas de IgG de pan-VHS-2 antes de la prueba de provocación, y el 100 % de estas cobayas sobrevivieron a la prueba de provocación vaginal con VHS-2 sin desarrollar ningún síntoma visible de enfermedad (**FIG. 4E**).

Se compararon los resultados de los experimentos de provocación vaginal con VHS-2 en ratones y cobayas (**FIG. 7**). En ambas especies, la inmunización con gD-2 provocó un aumento significativo de IgG de pan-VHS-2 que estuvo un promedio de 10 a 20 veces por encima del fondo, y que se correlacionó con una protección parcial frente a la provocación vaginal con el VHS-2 (**FIG. 7**). Por el contrario, los ratones o cobayas inmunizados con los virus VHS-2 MS o 0 $\Delta$ NLS vivos montaron producciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 que fueron de 30 a 40 veces mayores que en los animales inmunizados con gD-2 (**FIG. 7**). Del mismo modo, los ratones o cobayas inmunizados con MS o 0 $\Delta$ NLS excretaron un promedio de 20 a 35 veces menos de VHS-2 por vagina con respecto a los animales inmunizados con gD-2 (**FIG. 7**). Conjuntamente, estos resultados indicaron que el aumento de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 en ratones y cobayas inmunizados se correlacionaba con una mayor protección inducida por la vacuna contra el VHS-2 en términos de: 1) reducción de la excreción vaginal del virus de la provocación VHS-2; y 2) aumento de la frecuencia de supervivencia.

#### **El suero con anticuerpos contra el VHS-2 por sí solo ofrece una protección débil frente a la prueba de provocación con el VHS-2 MS**

Unas concentraciones altas de anticuerpos IgG de pan-VHS-2 se correlacionaron con una protección robusta frente a la prueba de provocación con VHS-2 MS en ratones inmunizados con varias vacunas vivas contra el VHS-2. Se realizó un experimento final para determinar si la transferencia adoptiva de suero con anticuerpos contra el VHS-2 daba lugar al nivel de protección frente al VHS-2 observado en ratones inmunizados con el virus VHS-2 0 $\Delta$ NLS.

Para este fin, se inmunizó a ratones de la línea 129 ( $n = 10$ ) en sus patas traseras derecha e izquierda con  $10^6$  UFP de VHS-2 0 $\Delta$ NLS en los días 0 y 30, respectivamente. El día 85, se sacrificaron cinco ratones inmunizados para recoger suero con anticuerpos contra el VHS-2 y, en este momento, se recogió suero no sometido previamente a experimentación de controles emparejados por la edad. El día 90, los ratones no sometidos previamente a experimentación recibieron una transferencia adoptiva de 0,25 ml de un mezcla de sueros no sometidos previamente a experimentación o suero con anticuerpos contra el VHS-2 ( $n = 5$  por grupo) y, a continuación, se sometieron a una prueba de provocación con 100 000 UFP por ojo de VHS-2 MS. Del mismo modo,  $n = 5$  ratones inmunizados con VHS-2 0 $\Delta$ NLS también se sometieron a una prueba de provocación con 100 000 UFP por ojo de VHS-2 MS.

Se comparó la excreción ocular de VHS-2 MS. El día 1 después de la prueba de provocación, los ratones tratados con suero no sometido previamente a experimentación excretaron un promedio de 3000 por ojo de VHS-2 MS,

mientras que los ratones tratados con suero con anticuerpos contra el VHS-2 excretaron un promedio de 16 veces menos de VHS-2 y esta diferencia fue significativa (**FIG. 5A**). Sin embargo, los ratones tratados con suero con anticuerpos contra el VHS-2 y los ratones tratados con suero no sometidos previamente a experimentación excretaron niveles altos y equivalentes de VHS-2 el día 3 después de la provocación ocular (**FIG. 5B**). Por el contrario, los ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS excretaron un promedio de 300 y 60 veces menos de VHS-2 MS los días 1 y 3, respectivamente, con respecto a los ratones tratados con suero no sometido previamente a experimentación (**FIG. 5A y 5B**).

La transferencia adoptiva de suero con anticuerpos contra el VHS-2 retrasó, pero no evitó, la progresión de la patogenia inducida por el VHS-2. Específicamente, el 100 % de los ratones tratados con suero no sometidos previamente a experimentación sucumbieron a la provocación ocular con el VHS-2 en los días 7 u 8 después de la provocación (**FIG. 5C**).

Dos de los 5 ratones tratados con suero con anticuerpos contra el VHS-2 sobrevivieron a la provocación ocular con VHS-2 y, como grupo, estos ratones sobrevivieron durante  $19 \pm 5$  días después de la provocación (**FIG. 5C**). Aunque los ratones tratados con suero con anticuerpos contra el VHS-2 sobrevivieron significativamente más tiempo, estos animales no estaban bien protegidos.

Específicamente, el 100 % de los ratones tratados con suero con anticuerpos contra el VHS-2 desarrollaron pérdida de pelaje periocular manifiesta y enfermedad entre los días 10 y 14 después de la provocación, y un 60 % de estos ratones sucumbieron a la provocación (**FIG. 5C**). Por el contrario, el 100 % de los ratones inmunizados con VHS-2 0ΔNLS sobrevivieron sin ningún signo evidente de enfermedad durante 30 días después de la provocación (**FIG. 5C**). Por lo tanto, aunque las concentraciones de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 se correlacionan con la protección inducida por la vacuna frente al VHS-2 (**FIG. 2, 3 y 4**), es poco probable que los anticuerpos contra el VHS-2 solos sean los únicos mediadores de la protección inducida por la vacuna frente a la provocación con el VHS-2.

## Análisis

### Análisis general

El estudio actual demuestra que las concentraciones en la circulación sanguínea del anticuerpo IgG contra pan-VHS-2 en ratones y cobayas vacunados se correlacionaron con la protección frente al VHS-2. No se ha determinado en este estudio si otros componentes de la respuesta inmunitaria adaptativa también se correlacionarían con la protección inducida por la vacuna frente al VHS-2. Por ejemplo, la frecuencia de linfocitos T específicos de VHS-2 [Laing *et al.*, 2010; St Leger *et al.*, 2011; Posavad *et al.*, 2010] o la abundancia de anticuerpos IgA contra el VHS-2 en la mucosa vaginal [Tirabassi *et al.*, 2011] puede proporcionar mejores correlaciones de inmunidad para una vacuna contra el VHS-2. Sin embargo, cabe destacar que la utilidad de un indicador de la inmunidad no depende de su papel en mediar en la protección. Más bien, un indicador de la inmunidad es una herramienta de cribado cuya utilidad radica únicamente en su capacidad para medir la magnitud de protección inducida por una vacuna frente a un patógeno microbiano. Queda por determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 serían útiles para medir la eficacia de una vacuna contra el VHS-2 en ensayos clínicos en humanos.

### Relevancia de la inmunidad humoral frente a celular en la protección inducida por vacunas frente al VHS-2

La relevancia de la inmunidad humoral frente a la celular en la protección inducida por una vacuna contra el VHS-2 sigue sin estar completamente definida. Lo que es evidente a partir de décadas de estudios que se remontan a Oakes, 1975, es que los anticuerpos contra el VHS transferidos de forma adoptiva o los linfocitos B por sí solos no son suficientes para evitar que la infección periférica por el VHS-1 progrese a una enfermedad mortal en ratones inmunodeficientes atímicos o con IDCG [Nagafuchi *et al.*, 1979; Halford *et al.*, 2005b]; mientras que los linfocitos T transferidos de forma adoptiva son suficientes para permitir que animales inmunodeficientes sobrevivan a una infección periférica con cepas de baja virulencia del VHS-1 [Nagafuchi *et al.*, 1979; Halford *et al.*, 2005b]. Además, los linfocitos T desempeñan un papel directo en el control de las infecciones por el VHS-1 y el VHS-2 en los ganglios sensitivos [Divito *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2003; Knickelbein *et al.*, 2008; Theil *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2000; Simmons y Tschärke, 1992; Zhu *et al.*, 2007]. Por tanto, la protección inducida por una vacuna contra el VHS-2 dependerá casi con seguridad de la respuesta de los linfocitos T a los antígenos del VHS-2 [Koelle y Corey, 2008; Johnston VHS, 2012; Laing VHS, 2012; Dudek y Knipe, 2006; Morrison, 2002].

La protección completa inducida por una vacuna contra las lesiones del herpes genital por el VHS-2 lo más probablemente dependerá de una respuesta equilibrada de linfocitos B (anticuerpos) y linfocitos T a los antígenos del VHS-2. Dos líneas de evidencia apoyan esta hipótesis. En primer lugar, los ratones con IDCG reconstituidos con linfocitos B y T controlan la infección por el VHS-1 significativamente más rápidamente que los ratones con IDCG reconstituidos con linfocitos T solos (**FIG. 1C** en Halford *et al.*, 2005b); numerosos investigadores han informado de hallazgos similares con el VHS-1 o el VHS-2 [Morrison *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2008; Staats *et al.*, 1991]. En segundo lugar, los linfocitos T solos son lentos para infiltrarse en los sitios de provocación con el VHS-1 o VHS-2, a menos que se usen quimiocinas [Shin e Iwasaki, 2012] o estímulos inflamatorios [Mackay *et al.*, 2012] para aumentar artificialmente la tasa de reclutamiento de linfocitos T. Por el contrario, los anticuerpos son ~100 mil millones de

veces más pequeños que los linfocitos T y pueden entrar rápidamente en los tejidos infectados por el virus; por consiguiente, los anticuerpos pueden actuar durante las primeras 24 horas para restringir la replicación y/o propagación del VHS-2 (**FIG. 5A**).

5 En este contexto, una función lógica para los anticuerpos contra el VHS-2 sería servir como la primera línea de defensa inmunitaria adaptativa que desencadena los eventos proinflamatorios (por ejemplo, la cascada del complemento) que promueven el rápido reclutamiento de linfocitos T en tejidos infectados por el virus en el portal de entrada del VHS-2 (por ejemplo, la vagina).

### **Correlatos de la inmunidad al VHS-2: Estudio actual frente a hallazgos anteriores**

10 Los intentos anteriores para identificar correlatos de la inmunidad al VHS-2 se han centrado en las respuestas inmunitarias a los inmunógenos en estudio; a saber, gB y/o gD [Shlapobersky *et al.*, 2012; Bernstein *et al.*, 2010; Bourne *et al.*, 2005; Bernstein, 2005; Bourne *et al.*, 2003; Khodai *et al.*, 2011; Bernstein *et al.*, 2011; Natuk *et al.*, 2006; Chentoufi *et al.*, 2010]. Estos enfoques no consideran el complemento completo de antígenos de VHS-2. Al menos 20 proteínas víricas son dianas conocidas de la respuesta de los linfocitos B y T humanos al VHS-2 [Hosken *et al.*, 2006; Laing *et al.*, 2010; Gilman *et al.*, 1981]. Dichos estudios centrados en la glucoproteína no han  
15 considerado adecuadamente que antígenos víricos distintos de gB-2 y gD-2 también puedan contribuir a la inmunidad al VHS-2.

20 Los correlatos de la inmunidad centrados en la glucoproteína sugieren que las vacunas con subunidades gB-2 y/o gD-2 deberían ser suficientes para evitar el herpes genital por el VHS-2 en humanos [Bernstein *et al.*, 2010; Bourne *et al.*, 2005; Bernstein, 2005; Bourne *et al.*, 2003]. Esta predicción no se ha confirmado con los datos de ensayos clínicos en humanos que abarcan los últimos 23 años [Belshe *et al.*, 2012; Stanberry *et al.*, 2002; Straus *et al.*, 1997; Corey *et al.*, 1999; Straus *et al.*, 1994; Mertz *et al.*, 1990]. La métrica de IgG de pan-VHS-2 es un correlato de la inmunidad más realista porque sopesa la abundancia relativa de anticuerpos IgG contra todos los antígenos de VHS-2, y por tanto no depende del supuesto de que la respuesta inmunitaria a 1 o 2 proteínas específicas proporcionará necesariamente un marcador preciso de la inmunidad al VHS-2.

25 Los resultados del estudio actual de dos células demuestran que la inmunización con una vacuna de gD-2 provoca una producción significativa de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 y una reducción significativa de la excreción vaginal de VHS-2 (**FIG. 7**). Sin embargo, los animales inmunizados con virus VHS-2 polivalentes montan una producción de IgG de pan-VHS-2 aproximadamente 30 veces mayor que los animales inmunizados con gD-2, y del mismo modo, presentan una excreción aproximadamente 25 veces más baja de VHS-2 vaginal después de la  
30 provocación (**FIG. 7**). Estos resultados aumentan la posibilidad de que, además de gD-2, respuestas inmunitarias dirigidas contra los otros 20 antígenos del VHS-2 también puedan contribuir a la eficacia protectora de una vacuna viva contra el VHS-2.

### **Uso del análisis de regresión para detectar un correlato de la inmunidad al VHS-2**

35 Varios estudios de provocación con una vacuna contra el VHS-2 han intentado medir la protección frente al VHS-2 en términos de puntuaciones de enfermedad, supervivencia o aumento de peso después de provocación con el VHS-2 [Khodai *et al.*, 2011; McClements *et al.*, 1996; Pyles *et al.*, 2002]. Los estadísticos no paramétricos (es decir, la enfermedad y la supervivencia) o los parámetros tangenciales (es decir, el aumento de peso) son probablemente medidas débiles de la variable primaria en estudio, la protección frente al VHS-2. Por el contrario, las reducciones en la excreción del virus de la provocación VHS-2 son una medida precisa de la protección frente al VHS-2 y varían en  
40 un intervalo de aproximadamente 500 veces. El uso de esta medida robusta de protección permitió que se aplicara un análisis de regresión lineal en el estudio actual para determinar si el aumento de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 (x) se correlacionaba con la protección frente al VHS-2 (y), como se medía por las reducciones de la excreción ocular o vaginal del VHS-2 (**FIG. 2C, 3C y 4C**).

45 El análisis de regresión lineal es una de las herramientas estadísticas más poderosas disponibles para determinar si existe una correlación entre dos variables. Se cree que el estudio actual es el primero en aplicar el análisis de regresión para detectar una correlación entre un parámetro de la respuesta inmunitaria adaptativa y la protección frente al VHS-2. Esta innovación fue fundamental para el éxito del estudio actual. La capacidad de detectar una correlación entre dos parámetros mediante análisis de regresión depende de tres variables. La variable 1 es el número de pares de datos x, y emparejados en el conjunto de datos. La variable 2 es la precisión de las mediciones  
50 de las variables x e y. La variable 3 es el intervalo de  $\Delta x$  y  $\Delta y$  sobre el cual se puede observar una correlación.

Con respecto a la variable 2, el ensayo de citometría de flujo introducido en el presente documento mejoró la precisión y la sensibilidad de las estimaciones de las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 (**FIG. 6 y 9C**), y, por tanto, mejoró el valor  $r^2$  de la correlación con respecto al ELISA de captura de anticuerpos. Esta innovación técnica mejoró la capacidad para detectar una correlación entre IgG de pan-VHS-2 (variable x) y las reducciones de  
55 excreción del virus de la provocación VHS-2 (variable y).

Con respecto a la variable 3, si el estudio actual se hubiera centrado exclusivamente en una modalidad de vacuna tal como la vacuna contra el VHS-2 0ΔNLS, entonces el intervalo observado de concentraciones de IgG de VHS-VHS-2 ( $\Delta x$ ) habría sido demasiado estrecho (aproximadamente 5 veces) para detectar una correlación

transcendente (**FIG. 3C** y **4C**). Sin embargo, al emplear seis inmunógenos del VHS-2 en tres experimentos de provocación independientes, el estudio pudo expandir el intervalo de concentraciones de IgG de pan-VHS-2 observadas a un intervalo de aproximadamente 500 veces (**FIG. 2C, 3C** y **4C**). Por tanto, el éxito del estudio actual fue muy dependiente del uso de un total de  $n = 117$  animales que ofrecieron conjuntamente un intervalo de 500 veces de concentraciones de IgG de pan-VHS-2 ( $\Delta x$ ) sobre los cuales el estudio podía someter a prueba disminuciones proporcionales de la excreción del virus de la provocación VHS-2 ( $y$ ).

### **Conclusión**

Los estudios actuales ilustran que lo divulgado demuestra que, en ratones y cobayas vacunados, la producción de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 en respuesta a varias vacunas varía en proporción a la protección frente al VHS-2. Es posible que este mismo enfoque pueda proporcionar una herramienta de cribado útil en ensayos clínicos en humanos de una vacuna contra el VHS-2. En base a los resultados, una formulación de vacuna contra el VHS-2 que provoque la producción de anticuerpos IgG contra pan-VHS-2 más potente y duradera en seres humanos debería provocar la mayor protección frente al herpes genital por el VHS-2. Sin embargo, la utilidad propuesta de IgG de pan-VHS-2 como indicador potencial de la protección inducida por una vacuna contra el VHS-2 aún no se ha sometido a prueba en humanos. Por lo tanto, será de interés someter a prueba esta predicción en los próximos años y determinar si las concentraciones de IgG de pan-VHS-2 proporcionan un indicador útil de la protección inducida por una vacuna contra el VHS-2 en humanos.

### **Citas**

- Allen *et al.*, (1990). Role of coexpression of IL-2 and herpes simplex virus proteins in recombinant vaccinia virus vectors on levels of induced immunity. *Viral Immunol* 3:207-215.
- Belshe *et al.* (2012). Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med* 366:34-43.
- Bernstein (2005). Glycoprotein D adjuvant herpes simplex virus vaccine. *Expert Rev Vaccines* 4:615-627.
- Bernstein *et al.* (2010). The adjuvant CLDC increases protection of a herpes simplex type 2 glycoprotein D vaccine in guinea pigs. *Vaccine* 28:3748-3753.
- Bernstein *et al.* (2011). Effects of herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines and CLDC adjuvant on genital herpes infection in the guinea pig. *Vaccine* 29:2071-2078.
- Bourne *et al.* (2003). Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis* 187:542-549.
- Bourne *et al.* (2005). Impact of immunization with glycoprotein D2/AS04 on herpes simplex virus type 2 shedding into the genital tract in guinea pigs that become infected. *J Infect Dis* 192:2117-2123.
- Brans *et al.* (2010). Immunization with a dominant-negative recombinant Herpes Simplex Virus (HSV) type 1 protects against HSV-2 genital disease in guinea pigs. *BMC Microbiology* 10:163.
- CDC (2010). Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 among persons aged 14-49 years--United States, 2005-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 59:456-459.
- Chentoufi *et al.* (2010). A novel HLA (HLA-A\*0201) transgenic rabbit model for preclinical evaluation of human CD8+ T cell epitope-based vaccines against ocular herpes. *J Immunol* 184:2561-2571.
- Chu *et al.* (2008). Antibody-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 disease in mice by Fc gamma receptor-dependent and - independent mechanisms. *J Reprod Immunol* 78:58-67.
- Corey *et al.* (1999). Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA* 282:331-340.
- Corey *et al.* (2004). Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* 350:11-20.
- DeJesus *et al.* (2003). Valacyclovir for the suppression of recurrent genital herpes in human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 188:1009-1016.
- Divito *et al.* (2006). A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res* 36:119-126.
- Dudek *et al.* (2006). Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* 344:230-239.
- Eo *et al.* (2001). Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J Immunol* 166:5473-5479.

- Gilman *et al.* (1981). Antibody responses in humans to individual proteins of herpes simplex viruses. *Infect Immun* 34:880-887.
- Golden *et al.* (2005). HSV-2 Western blot confirmatory testing among men testing positive for HSV-2 using the focus enzyme-linked immunosorbent assay in a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis* 32:771-777.
- 5 Gupta *et al.* (2007). Genital herpes. *Lancet* 370:2127-2137.
- Halford *et al.* (2005a). Mathematical analysis demonstrates that interferons-beta and -gamma interact in a multiplicative manner to disrupt herpes simplex virus replication. *J Theor Biol* 235:439-454.
- Halford *et al.* (2005b). Re-evaluating the role of natural killer cells in innate resistance to herpes simplex virus type 1. *Virology* 2:56.
- 10 Halford *et al.* (2010). Herpes simplex virus 2 ICPO mutant viruses are avirulent and immunogenic: implications for a genital herpes vaccine. *PLoS ONE* 5:e12251.
- Halford *et al.* (2011). A live-attenuated HSV-2 ICPO virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. *PLoS ONE* 6:e17748.
- 15 Halford *et al.* (2013). Pan-HSV-2 IgG antibody in vaccinated mice and guinea pigs correlates with protection against herpes simplex virus 2. *PLoS ONE* 8:e65523.
- Handsfield *et al.* (2007). Suppressive therapy with valacyclovir in early genital herpes: a pilot study of clinical efficacy and herpes-related quality of life. *Sex Transm Dis* 34:339-343.
- Hoskin *et al.* (2006). Diversity of the CD8+ T-cell response to herpes simplex virus type 2 proteins among persons with genital herpes. *J Virol* 80:5509-5515.
- 20 Johnston *et al.* (2012). HSV-2: in pursuit of a vaccine. *J Clin Invest* 121:4600-4609.
- Karem *et al.* (1997). Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration of recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strains expressing HSV antigens. *J Gen Virol* 78(Pt 2):427-434.
- Khanna *et al.* (2003). Herpes simplex virus-specific memory CD8(+) T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 18:593-603.
- 25 Khodai *et al.* (2011). Single and combination herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides or monophosphoryl lipid A exhibit differential immunity that is not correlated to protection in animal models. *Clin Vaccine Immunol* 18:1702-1709.
- Knickelbein *et al.* (2008). Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322:268-271.
- 30 Koelle *et al.* (2008). Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu Rev Med* 59:381-395.
- Kuklin *et al.* (1997). Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J Virol* 71:3138-3145.
- Laing *et al.* (2010). Diversity in CD8(+) T cell function and epitope breadth among persons with genital herpes. *J Clin Immunol* 30:703-722.
- 35 Laing *et al.* (2012). Immunology in the Clinic Review Series; focus on host responses: T cell responses to herpes simplex viruses. *Clin Exp Immunol* 167:47-58.
- Lingappa *et al.* (2007). Clinical and therapeutic issues for herpes simplex virus-2 and HIV co-infection. *Drugs* 67:155-174.
- 40 Liu *et al.* (2000). CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J Exp Med* 191:1459-1466.
- Mackay *et al.* (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7037-7042.
- Manickan *et al.* (1995). Vaccination with recombinant vaccinia viruses expressing ICP27 induces protective immunity against herpes simplex virus through CD4+ Th1+ T cells. *J Virol* 69:4711-4716.
- 45 McClements *et al.* (1996). Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11414-11420.

- Maignier *et al.* (1988). In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis* 158:602-614.
- Mertz *et al.* (1990). Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes infection. *J Infect Dis* 161:653-660.
- 5 Morrison (2002). Vaccines against genital herpes: progress and limitations. *Drugs* 62:1119-1129.
- Morrison *et al.* (2001). Vaccine-induced serum immunoglobulin contributes to protection from herpes simplex virus type 2 genital infection in the presence of immune T cells. *J Virol* 75:1195-1204.
- Nagafuchi *et al.* (1979). Mechanism of acquired resistance to herpes simplex virus infection as studied in nude mice. *J Gen Virol* 44:715-723.
- 10 Natuk *et al.* (2006). Recombinant vesicular stomatitis virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 gD elicit robust CD4+ Th1 immune responses and are protective in mouse and guinea pig models of vaginal challenge.. *J Virol* 80:4447-4457.
- Ng'ayo *et al.* (2011). Performance of HSV-2 type specific serological tests in men in Kenya. *J Virol Methods* 163:276-281.
- 15 Nicola *et al.* (1996). Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* 70:3815-3822.
- Norrild *et al.* (1981). Immunological reactivity of herpes simplex virus 1 and 2 polypeptides electrophoretically separated and transferred to diazobenzyloxymethyl paper. *Infect Immun* 31:660-667.
- 20 Oakes (1975). Role for cell-mediated immunity in the resistance of mice to subcutaneous herpes simplex virus infection. *Infect Immun* 12:166-172.
- Orr *et al.* (2007). Cutting Edge: Recombinant *Listeria monocytogenes* expressing a single immune-dominant peptide confers protective immunity to herpes simplex virus-1 infection. *J Immunol* 178:4731-4735.
- Paz-Bailey *et al.* (2007). Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect* 83:16-22.
- 25 Posavad *et al.* (2010). Detailed characterization of T cell responses to herpes simplex virus-2 in immune seronegative persons. *J Immunol* 184:3250-3259.
- Preacher *et al.* (2001). Calculation for Fisher's Exact Test: An interactive calculation tool for Fisher's exact probability test for 2x2 tables. [Computer software]. Disponible en <http://quantpsy.org>.
- 30 Pyles *et al.* (2002). Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 76:11387-11396.
- Rana *et al.* (2006). Sexual behaviour and condom use among individuals with a history of symptomatic genital herpes. *Sex Transm Infect* 82:69-74.
- Ratray *et al.* (1978). Recurrent genital herpes among women: symptomatic v. asymptomatic viral shedding. *Br J Vener Dis* 54:262-265.
- 35 Roizman *et al.* (1984). Identification and preliminary mapping with monoclonal antibodies of a herpes simplex virus 2 glycoprotein lacking a known type 1 counterpart. *Virology* 133:242-247.
- Rouse *et al.* (2006). A tale of 2 alpha-herpesviruses: lessons for vaccinologists. *Clin Infect Dis* 42:810-817.
- Samaniego *et al.* (1998). Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J Virol* 72:3307-3320.
- 40 Sánchez-Martínez *et al.* (1991). Evaluation of a test based on baculovirus-expressed glycoprotein G for detection of herpes simplex virus type-specific antibodies. *J Infect Dis* 164:1196-1199.
- Shin *et al.* (2012). A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature* 491:463-467.
- 45 Shlapobersky *et al.* (2012). Vaxfectin(R)-adjuvanted plasmid DNA vaccine improves protection and immunogenicity in a murine model of genital herpes infection. *J Gen Virol* 93:1305-1315.
- Simmons *et al.* (1992). Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J Exp Med* 175:1337-1344.

- Sperling *et al.* (2008). The effect of daily valacyclovir suppression on herpes simplex virus type 2 viral shedding in HSV-2 seropositive subjects without a history of genital herpes. *Sex Transm Dis* 35:286-290.
- St Leger *et al.* (2011). Defining the herpes simplex virus-specific CD8+ T cell repertoire in C57BL/6 mice. *J Immunol* 186:3927-3933.
- 5 Staats *et al.* (1991). Anti-glycoprotein D monoclonal antibody protects against herpes simplex virus type 1-induced diseases in mice functionally depleted of selected T-cell subsets or asialo GM1+ cells. *J Virol* 65:6008-6014.
- Stanberry *et al.* (2002). Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 347:1652-1661.
- Straus *et al.* (1994). Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* 343:1460-1463.
- 10 Straus *et al.* (1997). Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoprotein D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J Infect Dis* 176:1129-1134.
- Theil *et al.* (2003). Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 163:2179-2184.
- Tirabassi *et al.* (2011). A mucosal vaccination approach for herpes simplex virus type 2. *Vaccine* 29:1090-1098.
- 15 Tronstein *et al.* (2011). Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA* 305:1441-1449.
- Vergidis *et al.* (2009). Meta-analytical studies on the epidemiology, prevention, and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Infect Dis Clin North Am* 23:295-308.
- 20 Wald *et al.* (2000). Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 342:844-850.
- Wald *et al.* (2001). Effect of condoms on reducing the transmission of herpes simplex virus type 2 from men to women. *JAMA* 285:3100-3106.
- Warren (2002). Getting tested for herpes. *FDA Consum* 36:40.
- 25 Warren *et al.* (2005). Counseling the patient who has genital herpes or genital human papillomavirus infection. *Infect Dis Clin North Am* 19:459-476.
- Warren *et al.* (2011). Availability of serologic and virologic testing for herpes simplex virus in the largest sexually transmitted disease clinics in the United States. *Sex Transm Dis* 38:267-269.
- Weir *et al.* (1989). Recombinant vaccinia virus expressing the herpes simplex virus type 1 glycoprotein C protects mice against herpes simplex virus challenge. *J Gen Virol* 70(Pt 10):2587-2594.
- 30 Whittington *et al.* (2001). Use of a glycoprotein G-based type-specific assay to detect antibodies to herpes simplex virus type 2 among persons attending sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 28:99-104.
- Xu *et al.* (2006). Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* 296:964-973.
- 35 Zhu *et al.* (2007). 'Virus-specific CD8+ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J Exp Med* 204:595-603.

El uso en el presente documento del artículo "uno" o "una" pretende incluir uno o más.

Aunque varias modos de realización particulares del presente ensayo serológico se han descrito en el presente documento, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar cambios y modificaciones al mismo sin apartarse de la invención como se expone en las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

**1.** Un procedimiento de ensayo serológico para determinar si un sujeto está infectado por uno, los dos o ninguno del virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1) y el virus del herpes simple de tipo 2 (VHS-2), que comprende:

a) mezclar por separado al menos tres submuestras de suero idénticas que comprenden anticuerpos con uno de:

5 i) antígenos celulares de células no infectadas por el VHS-1 ni el VHS-2 en una matriz física,

(ii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-1 en una matriz física, o

(iii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-2 en una matriz física,

para formar al menos tres mezclas de antígenos celulares de submuestras de suero, y mantener cada una de dichas mezclas durante un período de tiempo suficiente para que los anticuerpos presentes en cada una de dichas submuestras se unan a dichos antígenos celulares citados para formar mezclas incubadas que contengan anticuerpos unidos a la matriz y al menos tres submuestras de suero preadsorbido;

10

b) separar los anticuerpos unidos a la matriz de al menos tres submuestras de suero preadsorbido;

c) mezclar por separado cada una de dichas submuestras de suero preadsorbido separadas con una mezcla que comprende tres poblaciones de células fijadas en la que la mezcla incluye células fijadas no infectadas por el VHS-1 o el VHS-2, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2, y en la que las poblaciones de células fijadas se pueden distinguir entre sí por emisiones de fluorescencia cuando se irradian, y mantener dichas mezclas durante un período de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos presentes dentro de cada submuestra preadsorbida se unan a una o más de las poblaciones de células fijadas; y

15

d) medir la cantidad de unión de los anticuerpos en cada una de las poblaciones de células fijadas usando citometría de flujo para determinar con cuál de las poblaciones de células fijadas se unen los anticuerpos de las submuestras preadsorbidas,

20

y, de este modo, si el sujeto fue infectado por uno, los dos o ninguno del VHS-1 y el VHS-2.

**2.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los antígenos celulares en una matriz física de la etapa a) (i), (ii) y (iii) comprenden células fijadas no infectadas, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2.

25

**3.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células fijadas de las etapas c) y d) presentan fluorescencia de manera distinguible cuando se irradian con longitudes de onda de luz que excitan un colorante fluorescente introducido de forma exógena.

**4.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el colorante fluorescente introducido de forma exógena es un tinte, opcionalmente en el que el tinte es carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE).

30

**5.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que el colorante fluorescente introducido de forma exógena forma un enlace covalente con la célula fijada o es una proteína fluorescente expresada intracelularmente.

**6.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que dicho colorante fluorescente introducido de forma exógena es una proteína expresada intracelularmente.

35

**7.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que el colorante fluorescente introducido de forma exógena forma un enlace covalente con la célula fijada.

**8.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las células fijadas con las que se unen los anticuerpos de las submuestras preadsorbidas se determinan por inmunorreacción de los inmunorreactivos unidos a células fijadas con anticuerpos contra las globulinas humanas marcados para formar células fijadas unidas marcadas por anticuerpos.

40

**9.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dichos anticuerpos contra las globulinas humanas marcados se marcan con un compuesto cuyo espectro de emisión de fluorescencia se puede distinguir del espectro de emisión de fluorescencia de cualquier otro fluoróforo utilizado en el ensayo.

45

**10.** El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el marcador de dichos anticuerpos contra las globulinas humanas marcados es una molécula fluorescente enlazada a un anticuerpo o fluoróforo.

**11.** Un kit de ensayo serológico para determinar si un sujeto está infectado por uno, los dos o ninguno del virus del herpes simple de tipo 1 y el virus del herpes simple de tipo 2, que comprende lo siguiente:

50

- a) tres recipientes separados que comprenden uno de:
- i) antígenos celulares de células no infectadas en una matriz física,
  - (ii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-1 en una matriz física, y
  - (iii) antígenos celulares de células infectadas por el VHS-2 en una matriz física; y
- 5 b) un cuarto recipiente que comprende una mezcla de tres poblaciones celulares fijadas, en la que la mezcla incluye células fijadas no infectadas por el VHS-1 o el VHS-2, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2, y en la que las poblaciones de células fijadas se pueden distinguir entre sí por la emisión de fluorescencia cuando se irradian.
- 10 **12.** El kit de ensayo serológico de acuerdo con la reivindicación 11, que incluye además un quinto recipiente que contiene anticuerpos contra las globulinas humanas marcados.
- 13.** El kit de ensayo serológico de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el marcador de dichos anticuerpos contra las globulinas humanas marcados es un compuesto que, cuando se irradia, proporciona un espectro de emisión de fluorescencia que se puede distinguir del de cualquier otro fluoróforo utilizado en el ensayo.
- 15 **14.** El kit de ensayo serológico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que la matriz física de la etapa a) (i), (ii) y (iii) comprende células fijadas no infectadas, células fijadas infectadas por el VHS-1 y células fijadas infectadas por el VHS-2, respectivamente, en el que opcionalmente la matriz física de la etapa a) (i), (ii) y (iii) es del mismo género y especie que las poblaciones de células fijadas en la mezcla.
- 20 **15.** El kit de ensayo serológico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que las células fijadas de dicho cuarto recipiente incluyen además un colorante fluorescente introducido de forma exógena por el cual las células que contienen cada uno de los tres antígenos celulares problema citados se pueden distinguir entre sí por la intensidad de fluorescencia en un espectro de emisión definido, que es distinguible y no se superpone con el espectro de emisión de fluorescencia de cualquier otro fluoróforo utilizado en el ensayo.

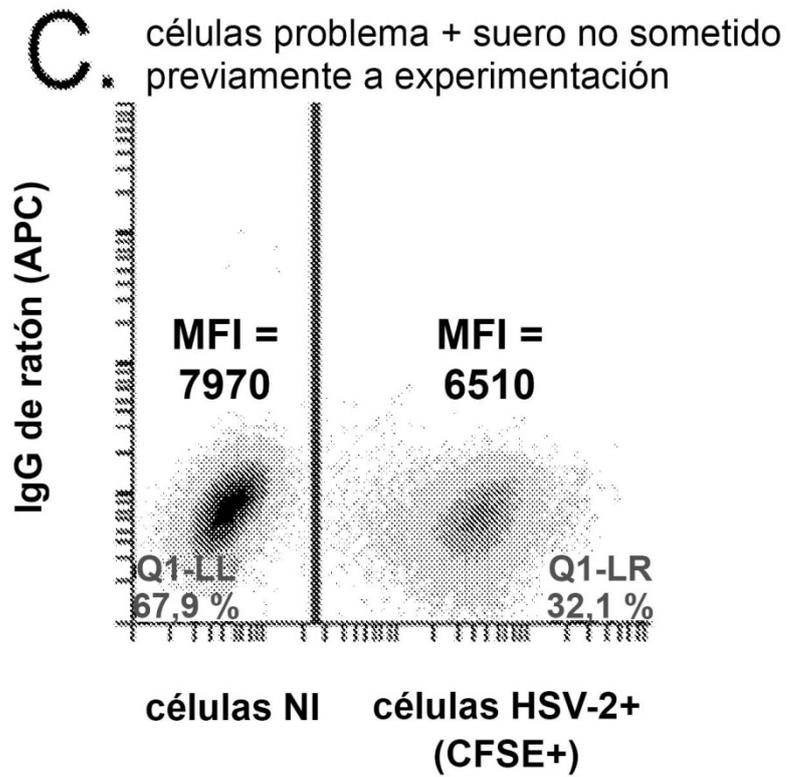
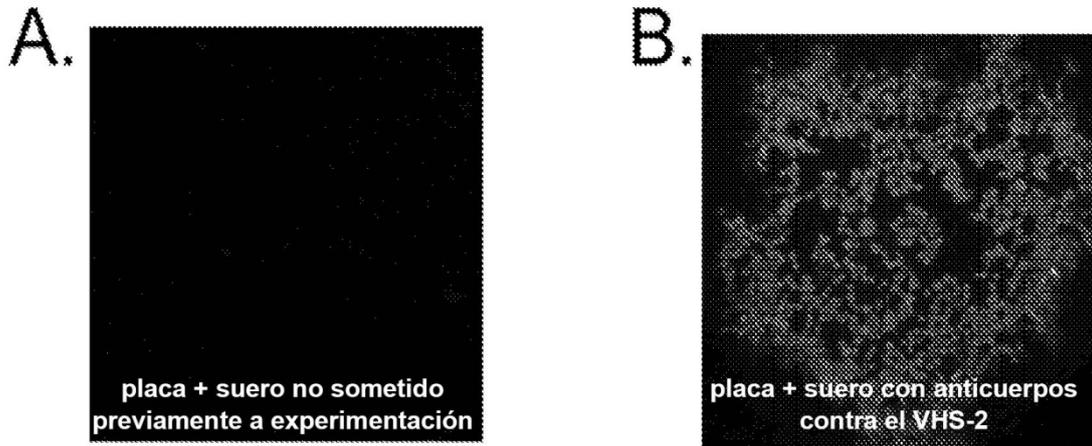
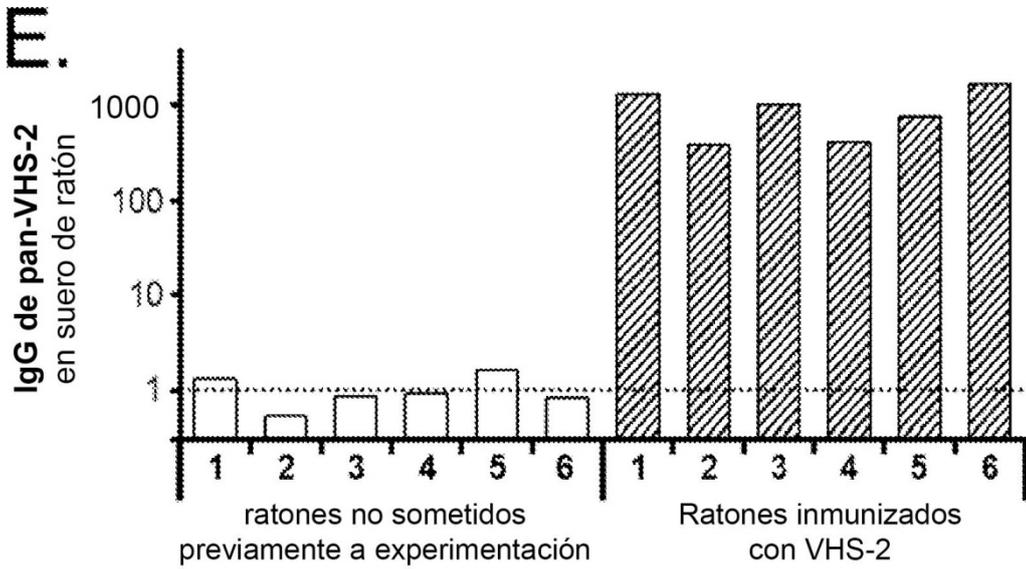
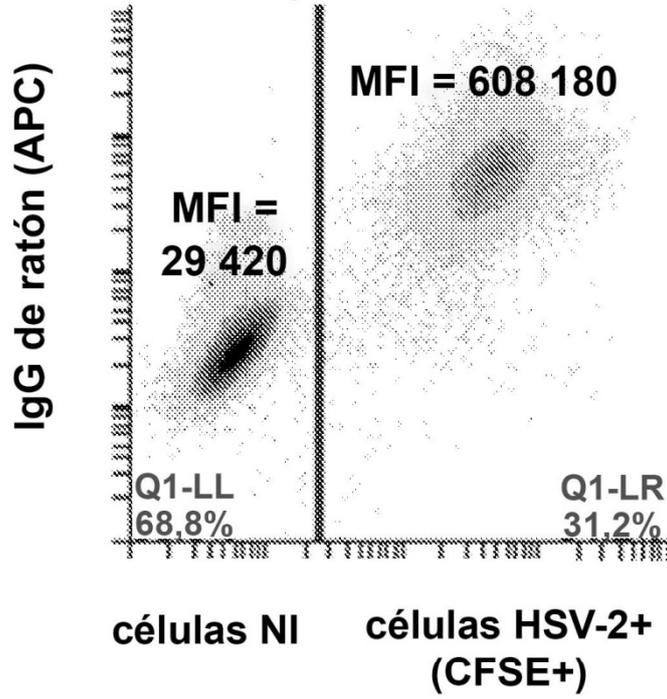


FIG. 1

**D** células problema + suero con anticuerpos contra el VHS-2

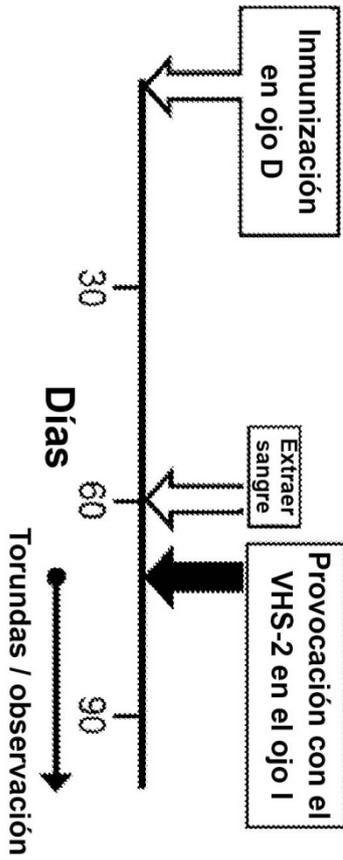


**FIG. 1 Cont.**

**A.**

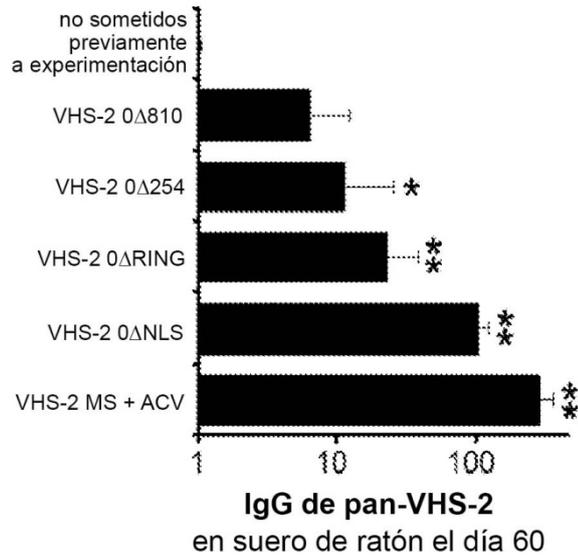
**Immunógenos víricos:**

- medio de cultivo (no sometidos previamente a experimentación)
- VHS-2 0Δ810
- VHS-2 0Δ254
- VHS-2 0ΔRING
- VHS-2 0ΔNLS
- VHS-2 MS (restringido con ACV)

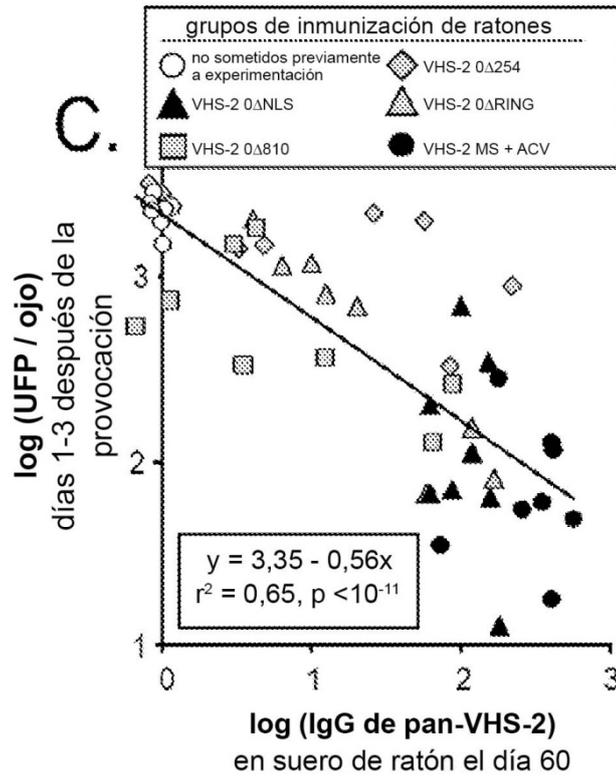


**FIG. 2**

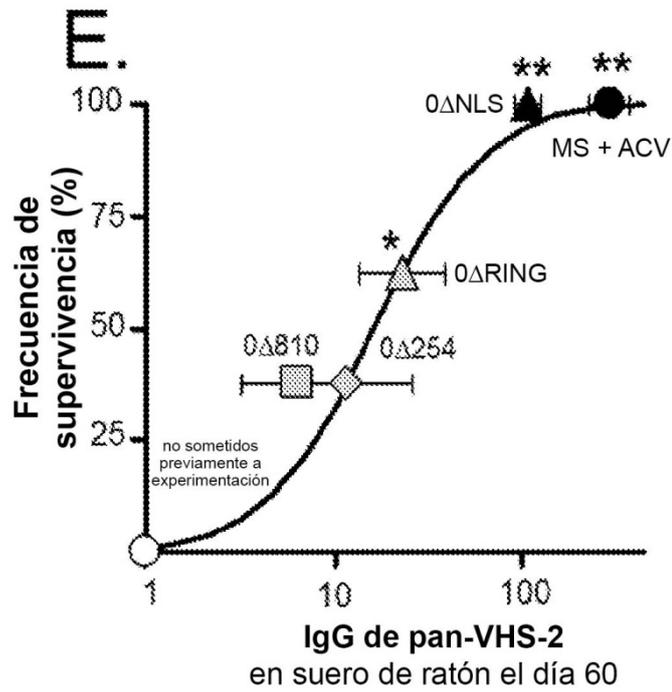
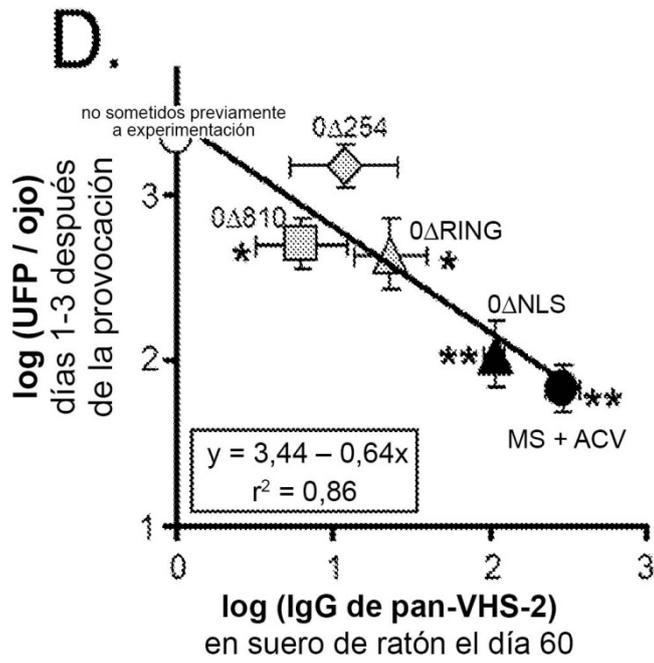
**B.**



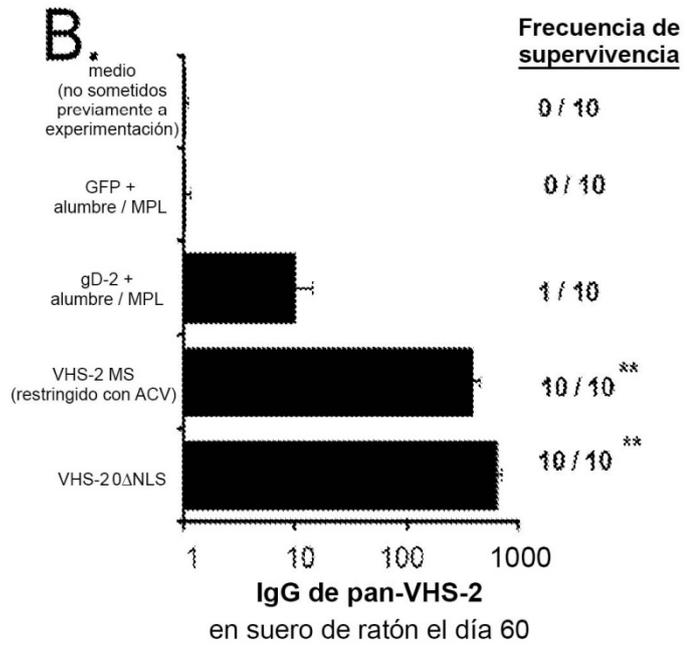
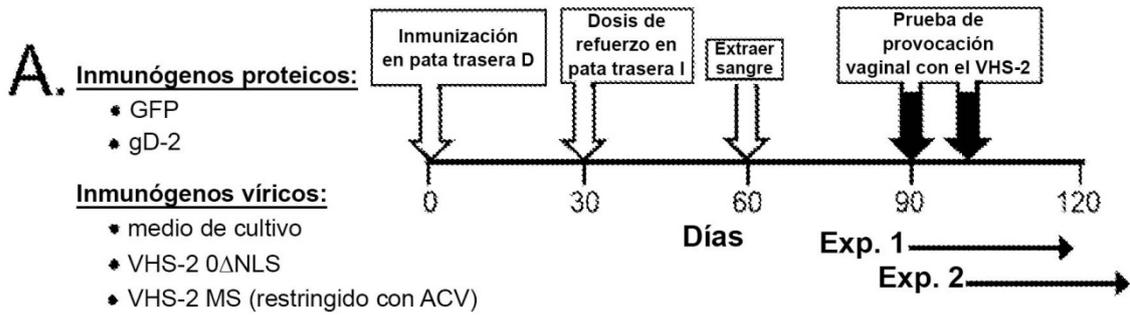
**C.**



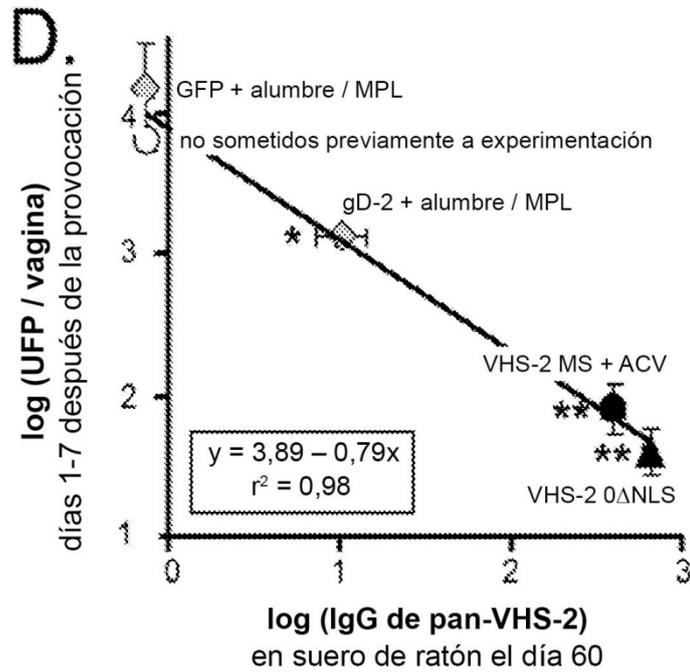
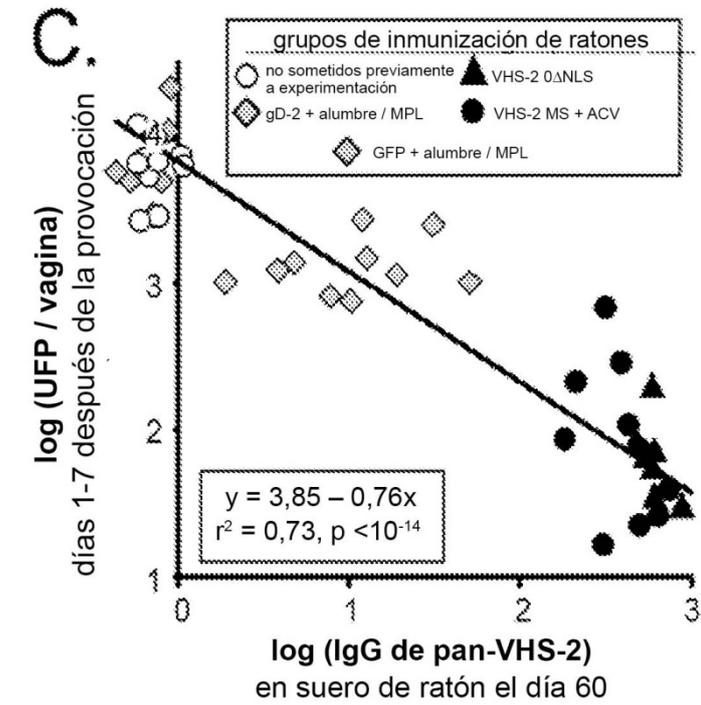
**FIG. 2 Cont.**



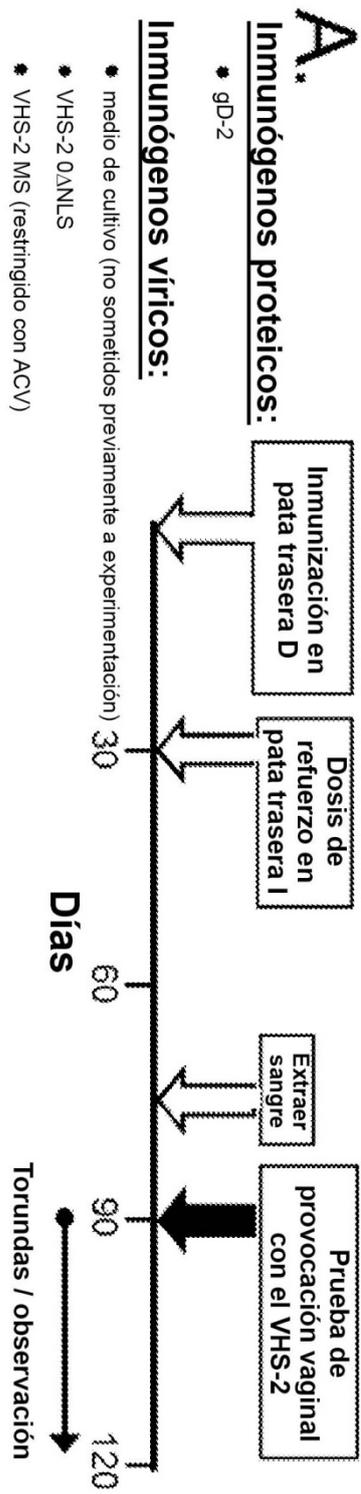
**FIG. 2 Cont.**



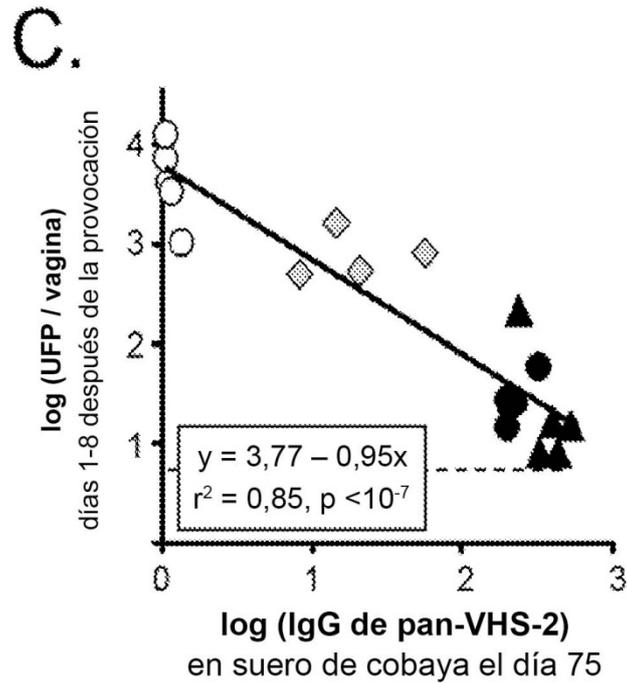
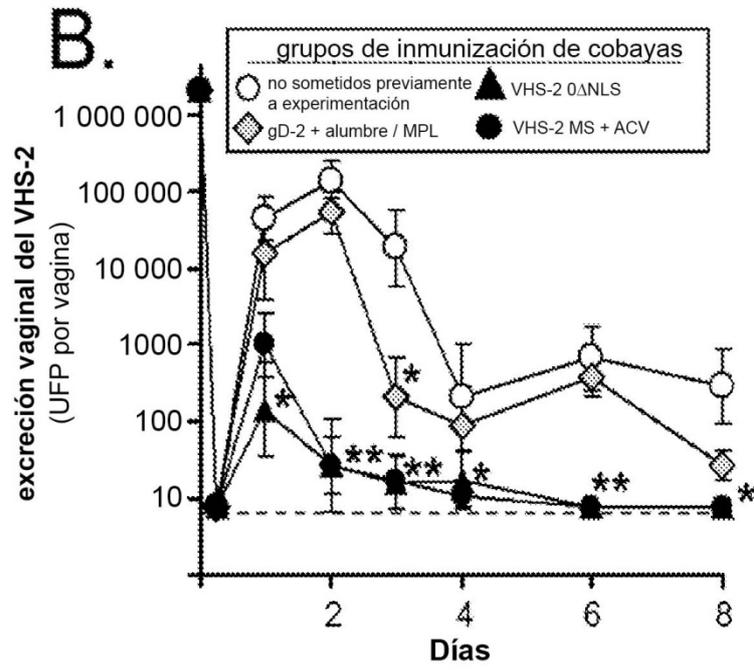
**FIG. 3**



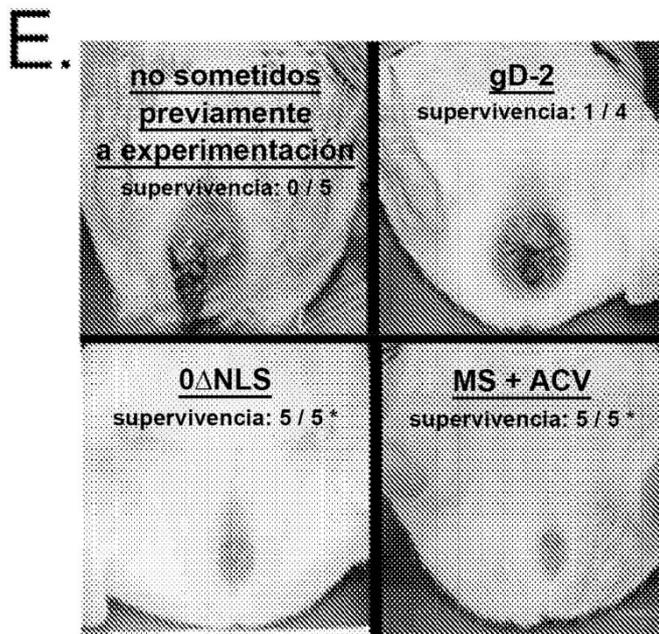
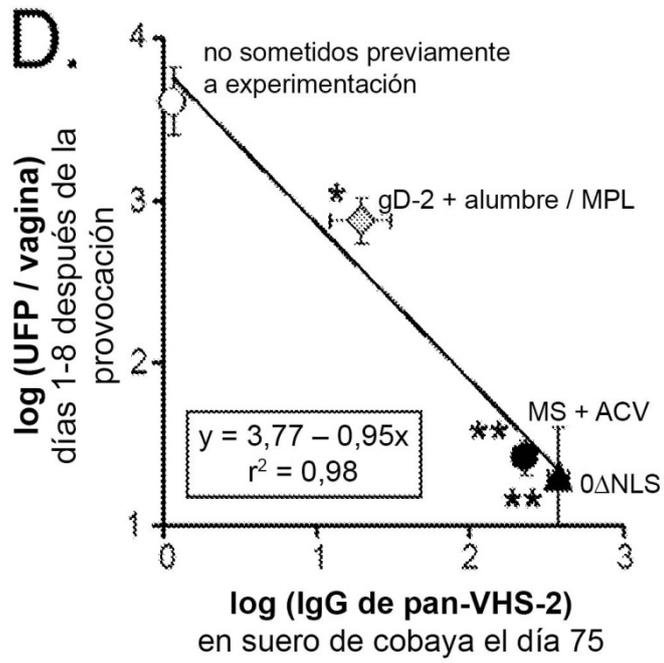
**FIG. 3 Cont.**



**FIG. 4**

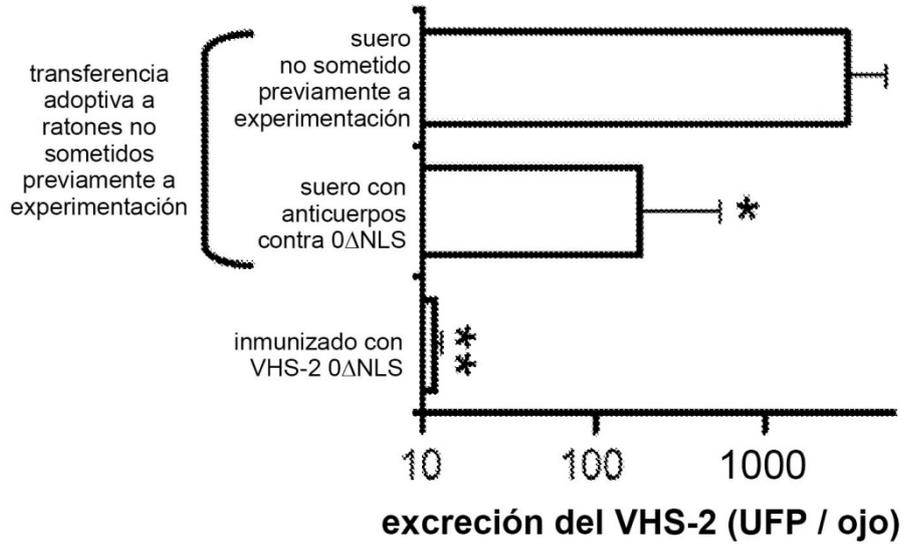


**FIG. 4 Cont.**

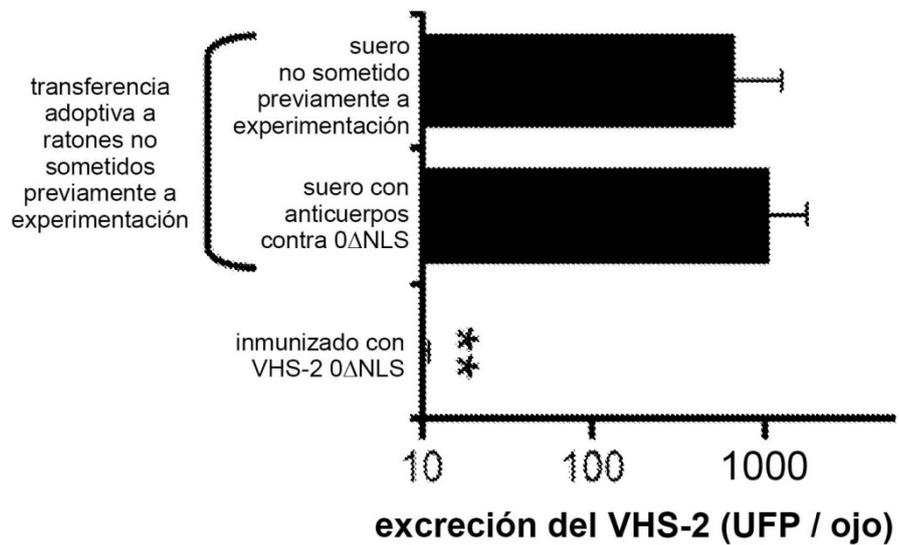


**FIG. 4 Cont.**

### A. Día 1 después de la provocación



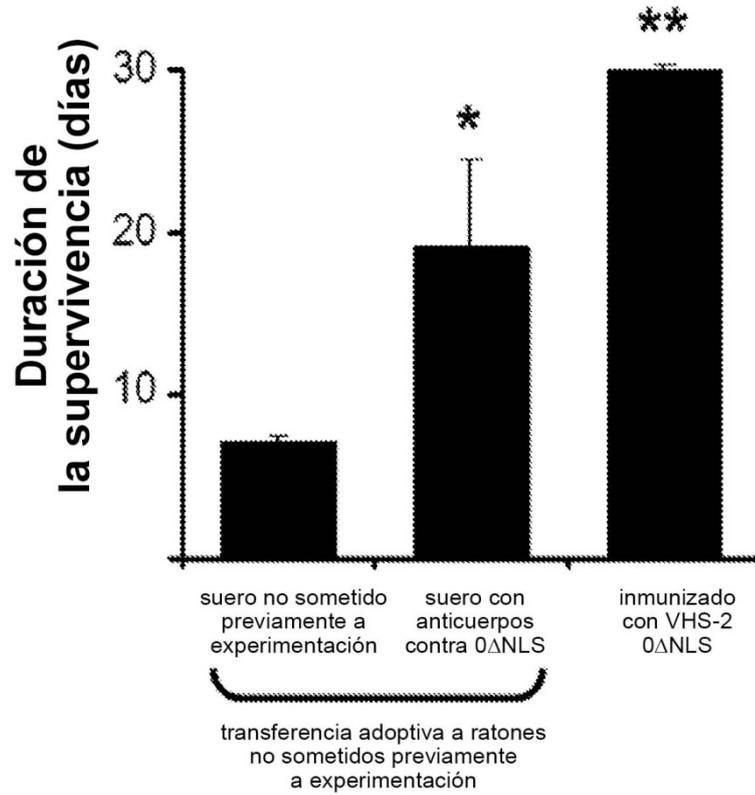
### B. Día 3 después de la provocación



**FIG. 5**

**C.**

	Frecuencia de		
- <u>supervivencia</u> :	0 / 5	2 / 5	5 / 5 <sup>*</sup>
- <u>enfermedad</u> :	100 %	100 %	0 %



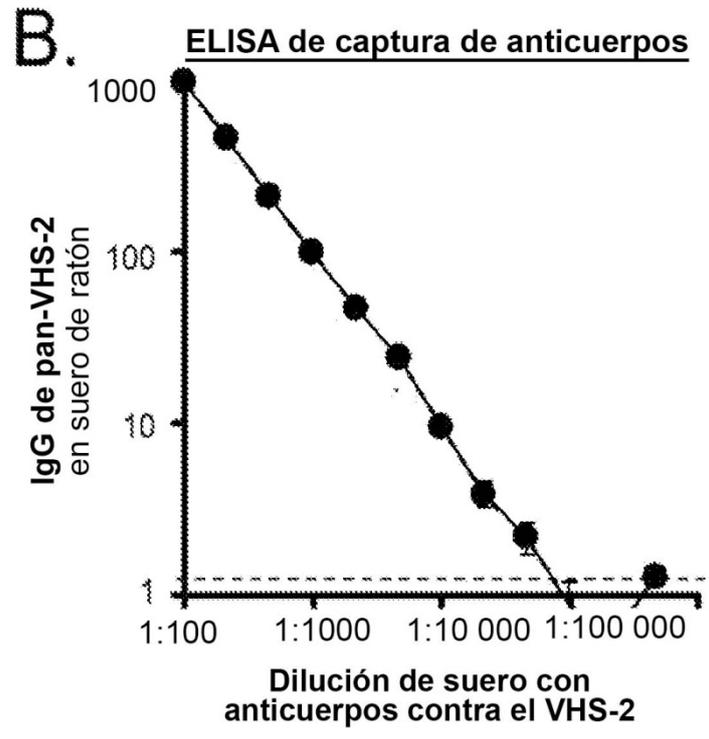
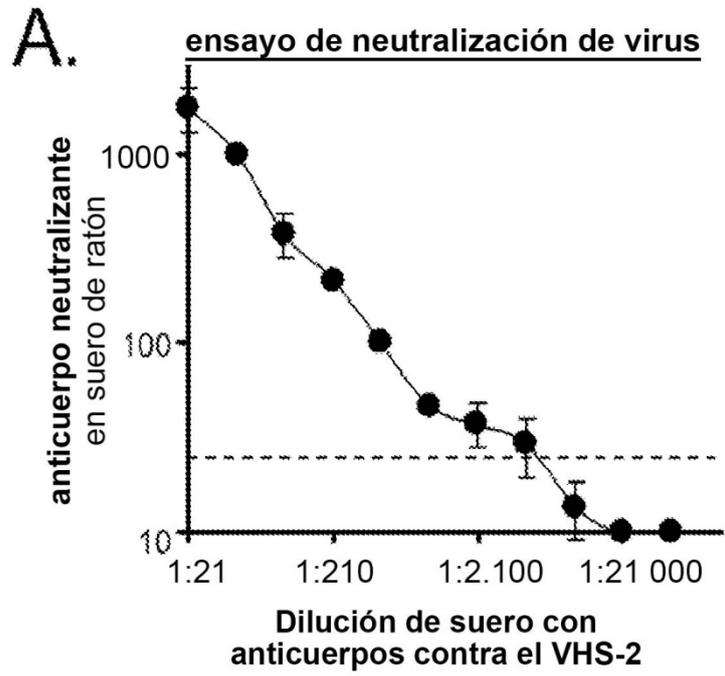
**FIG. 5 Cont.**

	<b>Ensayo de neutralización</b>	<b>ELISA (Ag total de VHS-2)</b>	<b>Ensayo de citometría de flujo</b>
Intervalo lineal <sup>a</sup>	1:21-1:1000	1:100-1:100 000	1:6000-1:6 000 000
Coefficiente de variación <sup>b</sup>	16 ± 8 %	13 ± 3 %	5 ± 1 %
Bondad de ajuste <sup>c</sup> (regresión lineal)	r <sup>2</sup> = 1,00 (p < 10 <sup>-5</sup> )	r <sup>2</sup> = 1,00 (p < 10 <sup>-10</sup> )	r <sup>2</sup> = 1,00 (p < 10 <sup>-12</sup> )

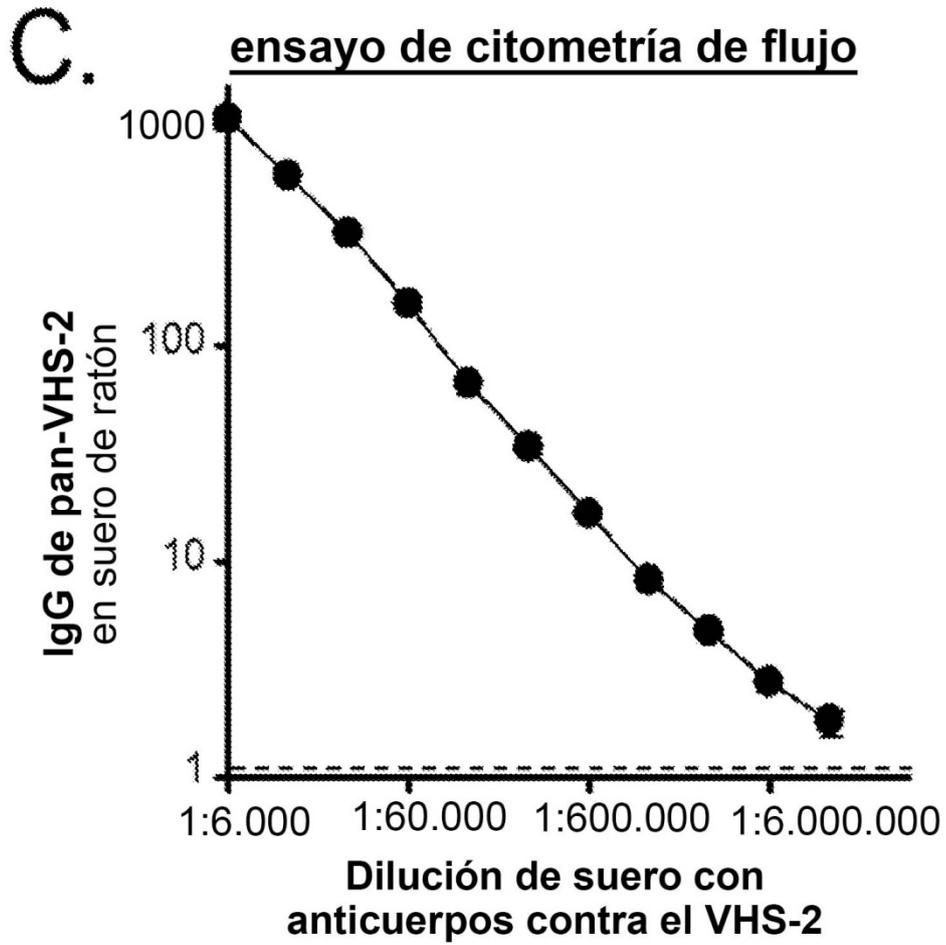
**FIG. 6**

Immunógeno <sup>a</sup>	Especie <sup>b</sup>	log (IgG de pan-VHS-2) <sup>c</sup>	Disminución log de excreción vaginal del VHS-2	Frecuencia de supervivencia <sup>e</sup>
Medio (no sometidos previamente a experimentación)	ratones	-0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0 / 10
	cobayas	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,2	0 / 5
GFP + alumbre / MPL	ratones	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,3	0 / 10
	cobayas	ND <sup>f</sup>	ND	ND
gD-2 + alumbre / MPL	ratones	1,0 ± 0,1**	0,7 ± 0,1*	1 / 10
	cobayas	1,3 ± 0,2**	0,7 ± 0,1*	1 / 4
VHS-2 MS (restringido con ACV)	ratones	2,6 ± 0,1**	1,9 ± 0,2**	10 / 10 <sup>††</sup>
	cobayas	2,4 ± 0,1**	2,2 ± 0,1**	5 / 5 <sup>†</sup>
	ratones	2,8 ± 0,1**	2,2 ± 0,2**	10 / 10 <sup>††</sup>
VHS-2 ΔNLS	cobayas	2,6 ± 0,1**	2,3 ± 0,3**	5 / 5 <sup>†</sup>

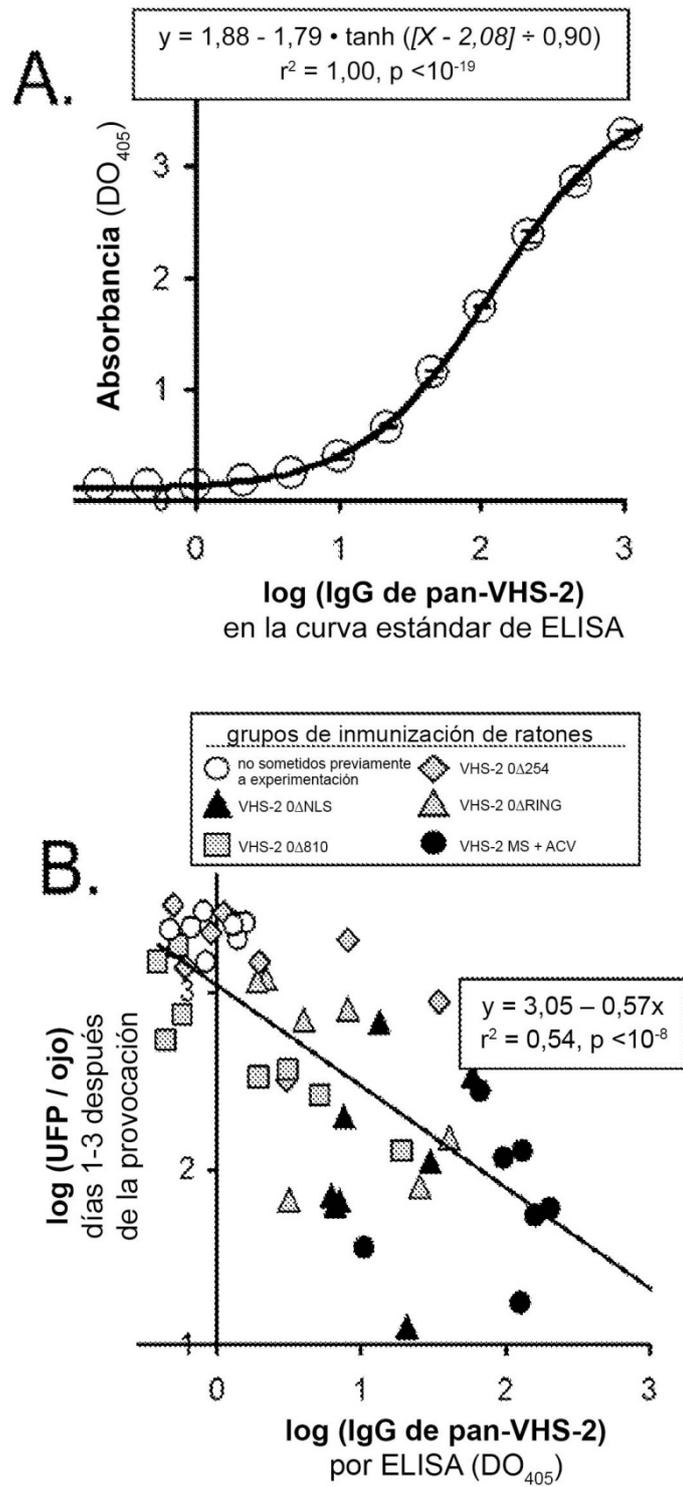
FIG. 7



**FIG. 8**



**FIG. 8 Cont.**



**FIG. 9**

C.

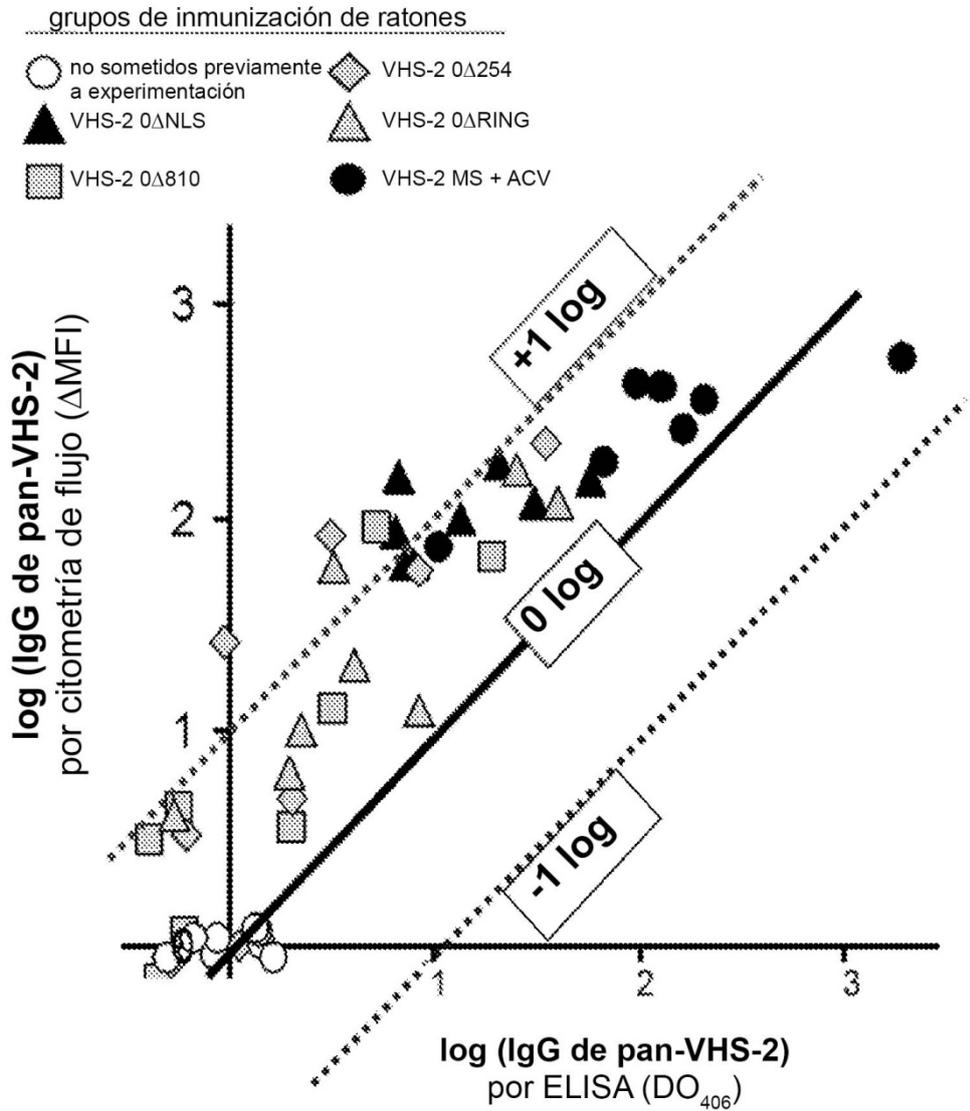
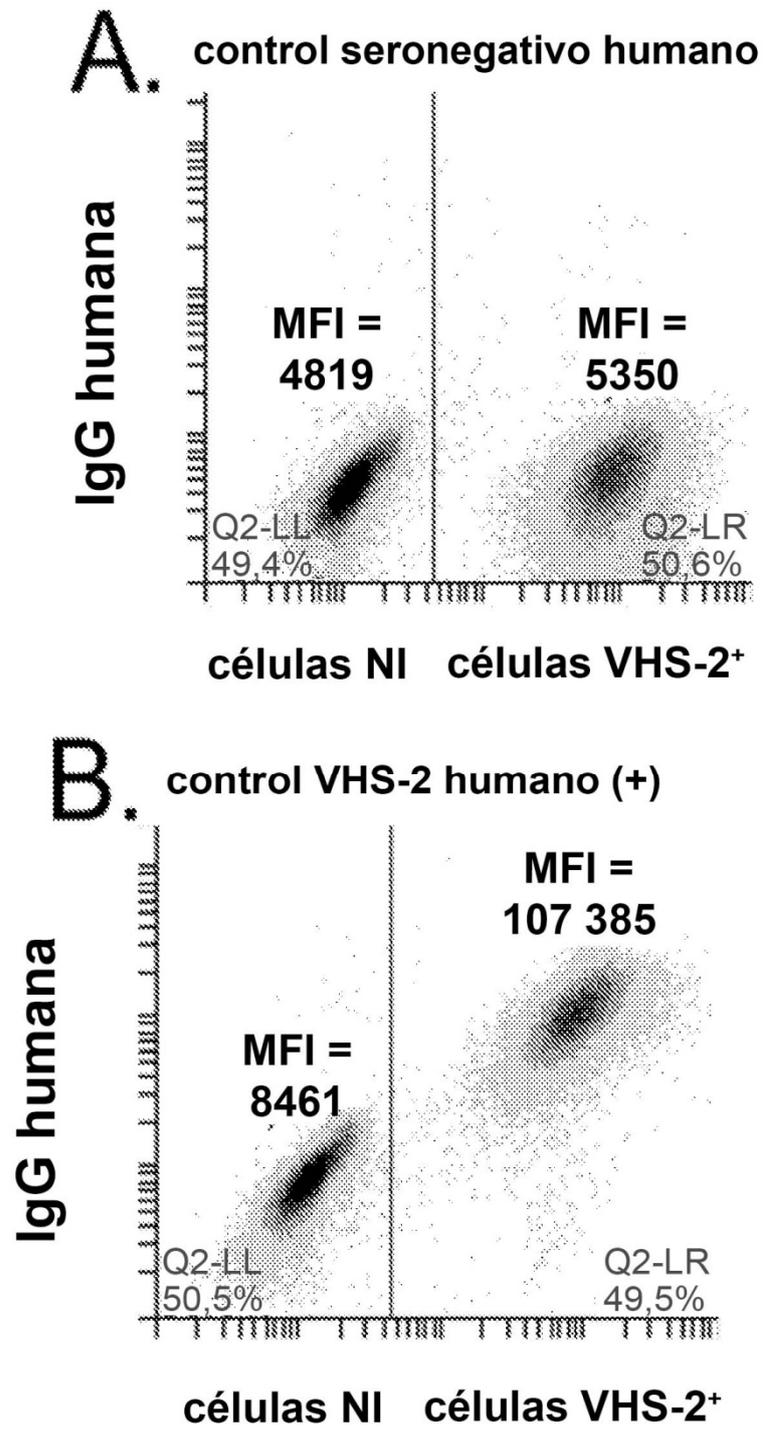
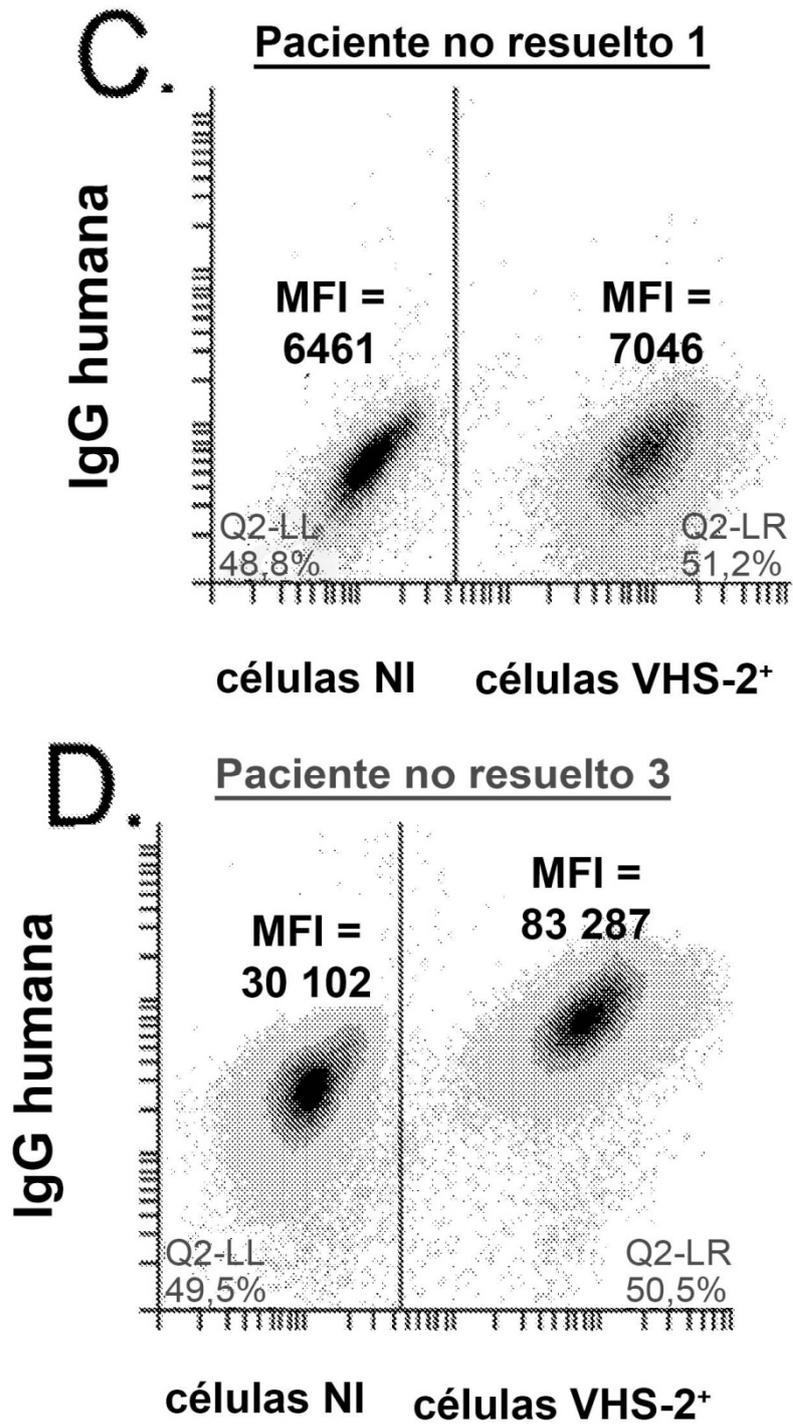


FIG. 9 Cont.



**FIG. 10**



**FIG. 10 Cont.**

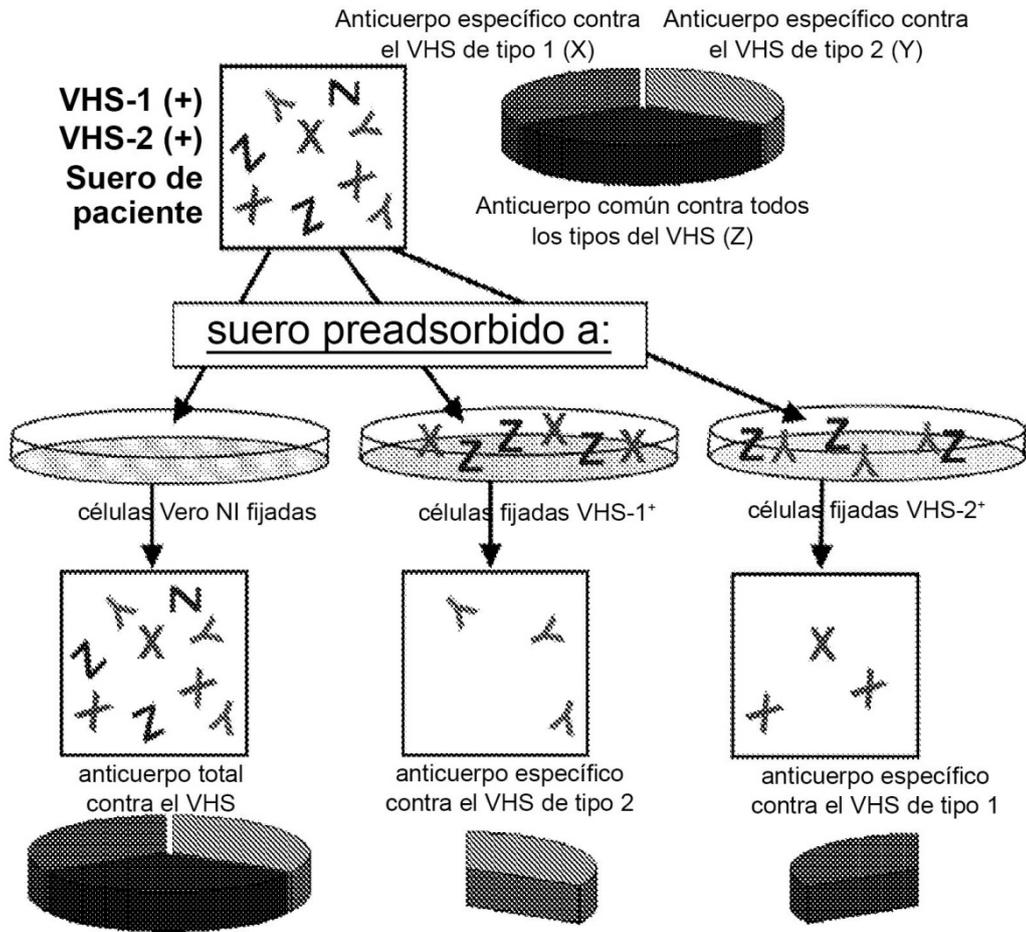
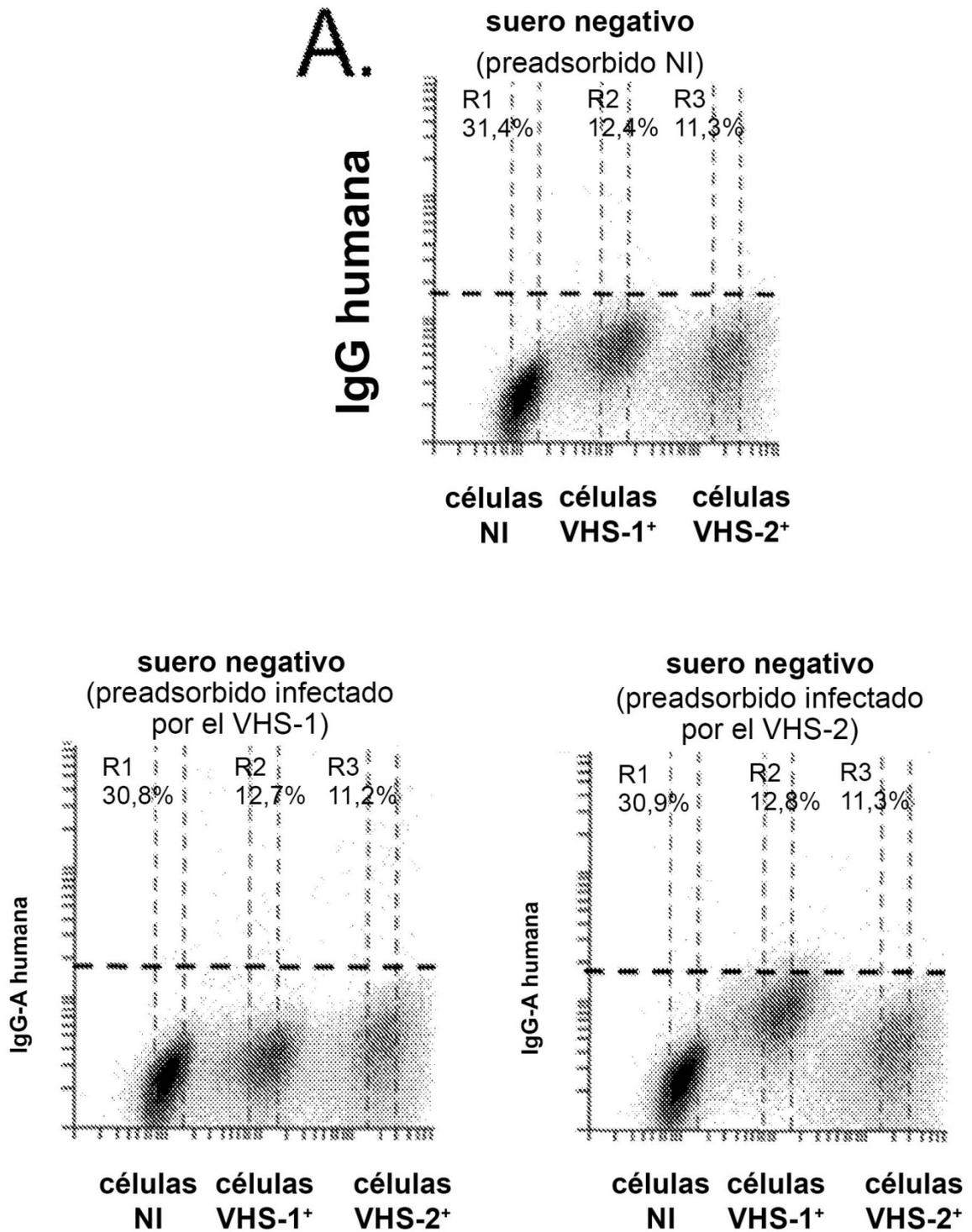
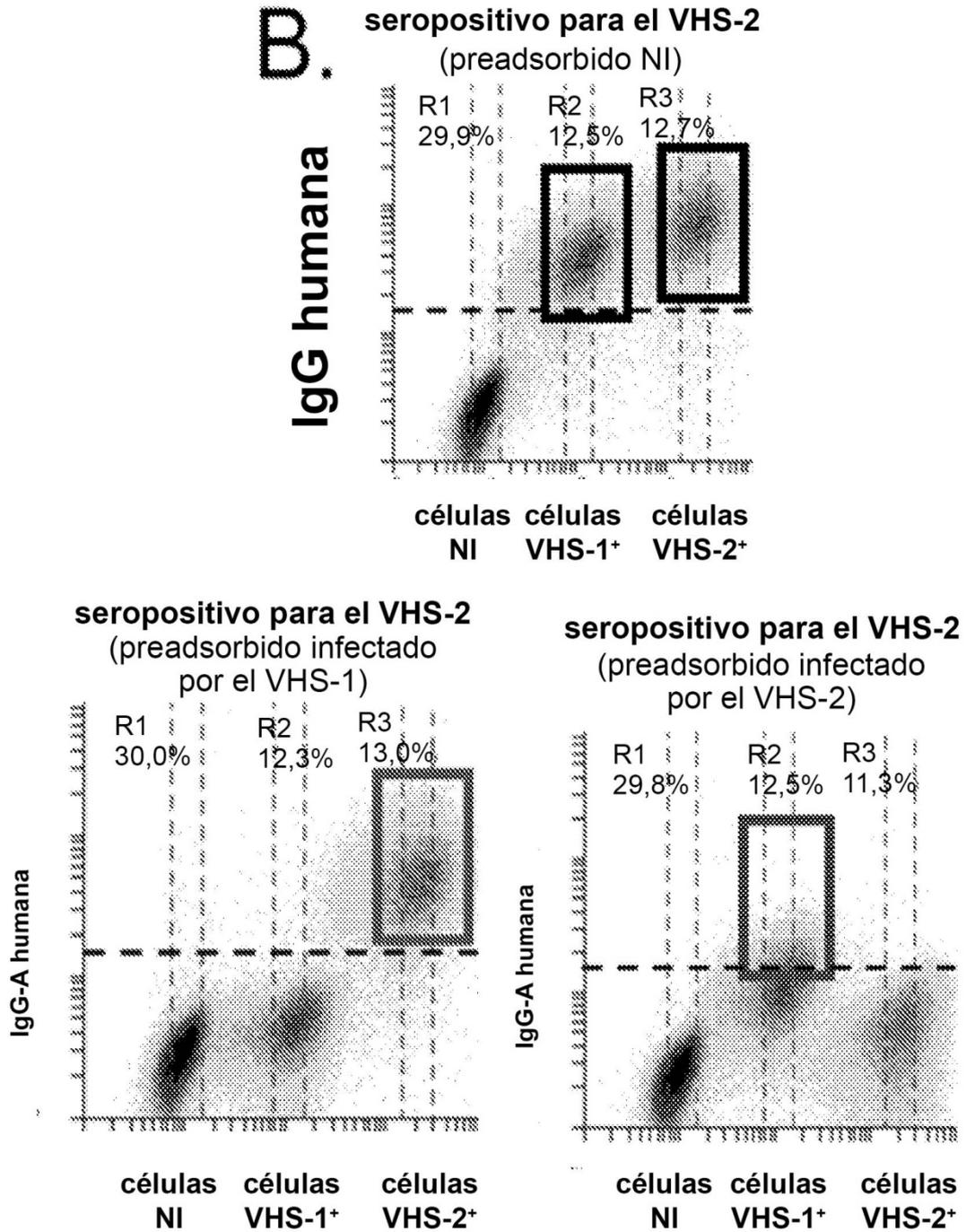


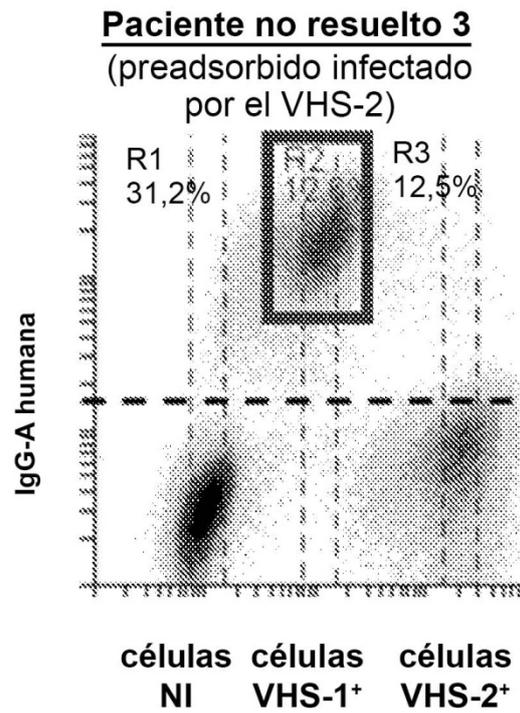
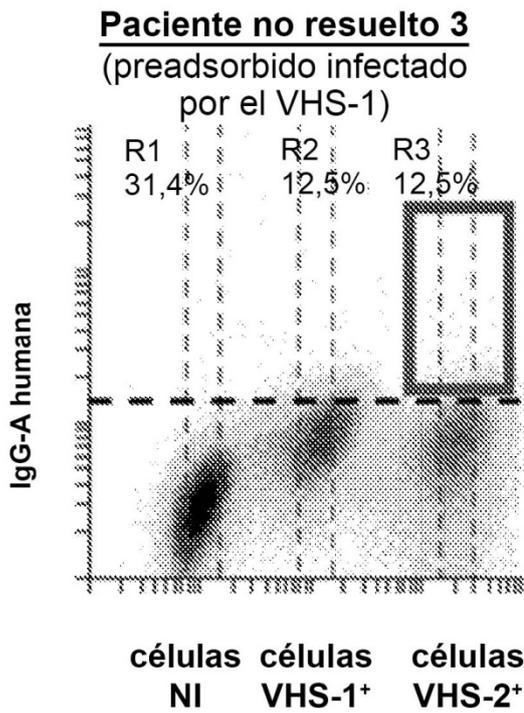
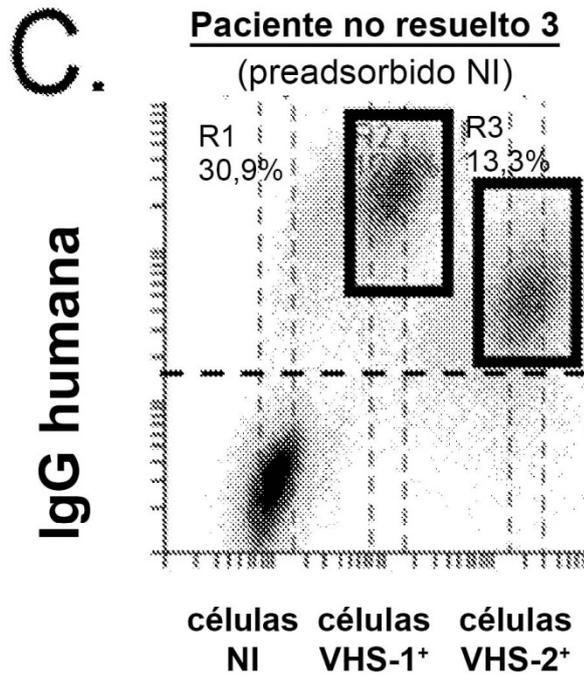
FIG. 11



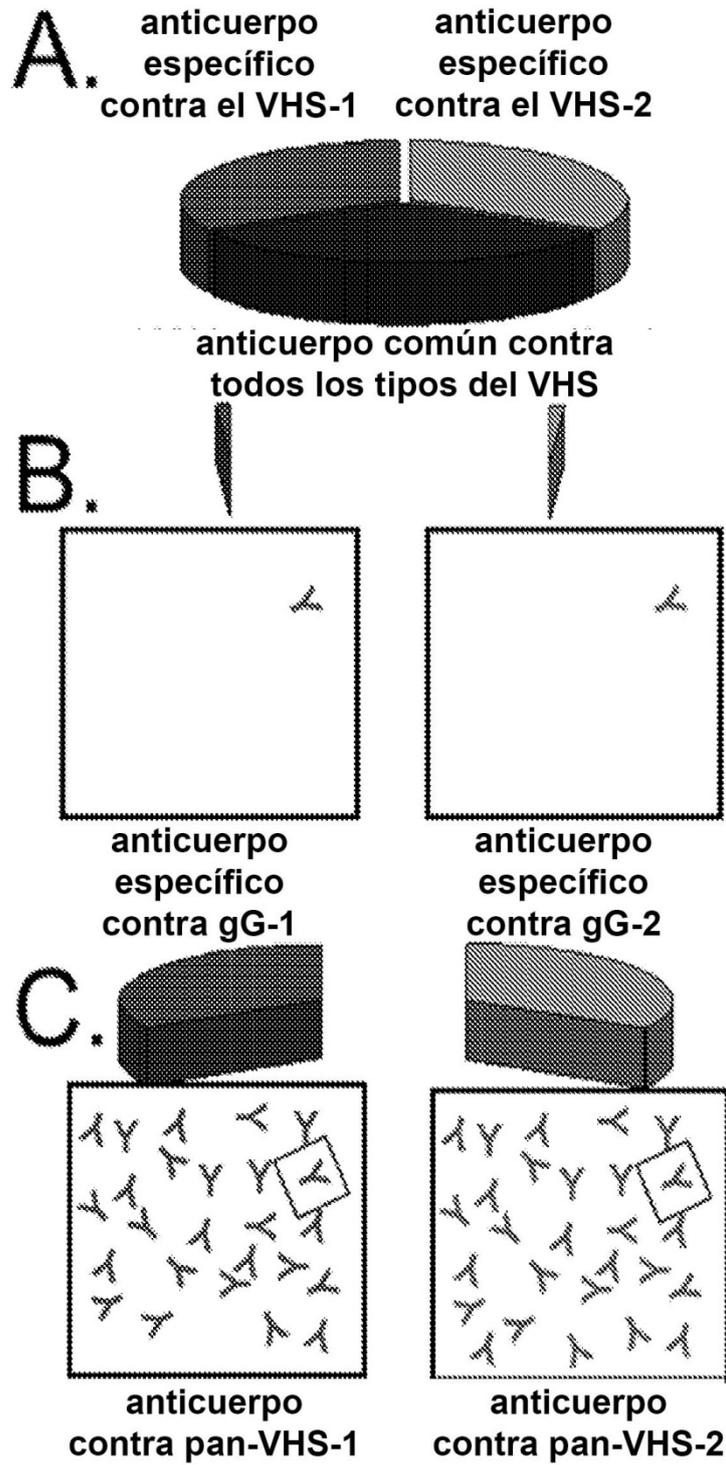
**FIG. 12**



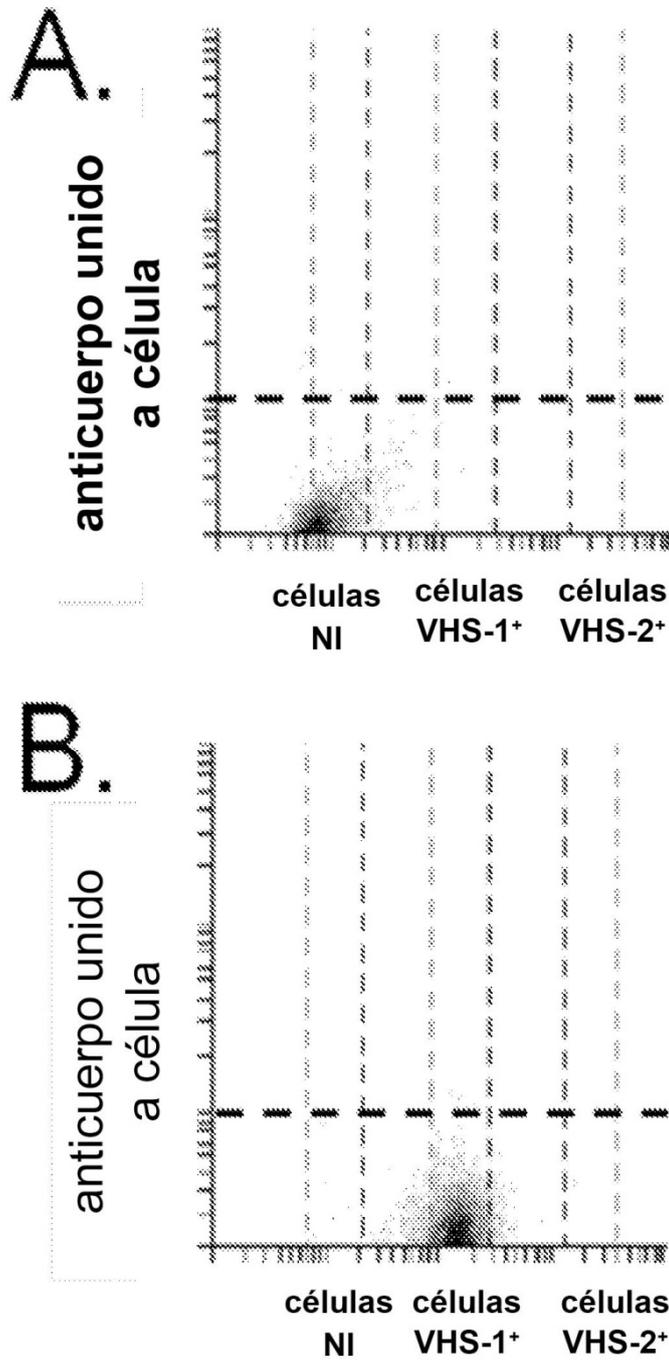
**FIG. 12 Cont.**



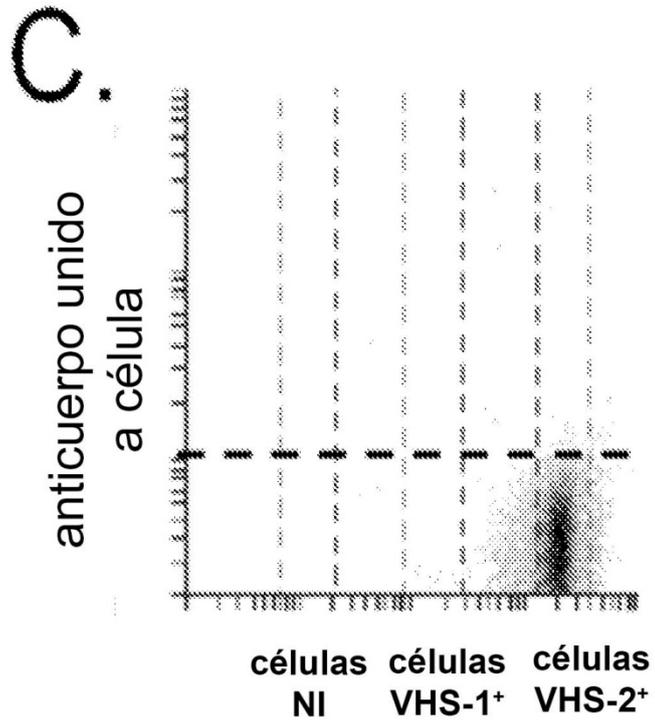
**FIG. 12 Cont.**



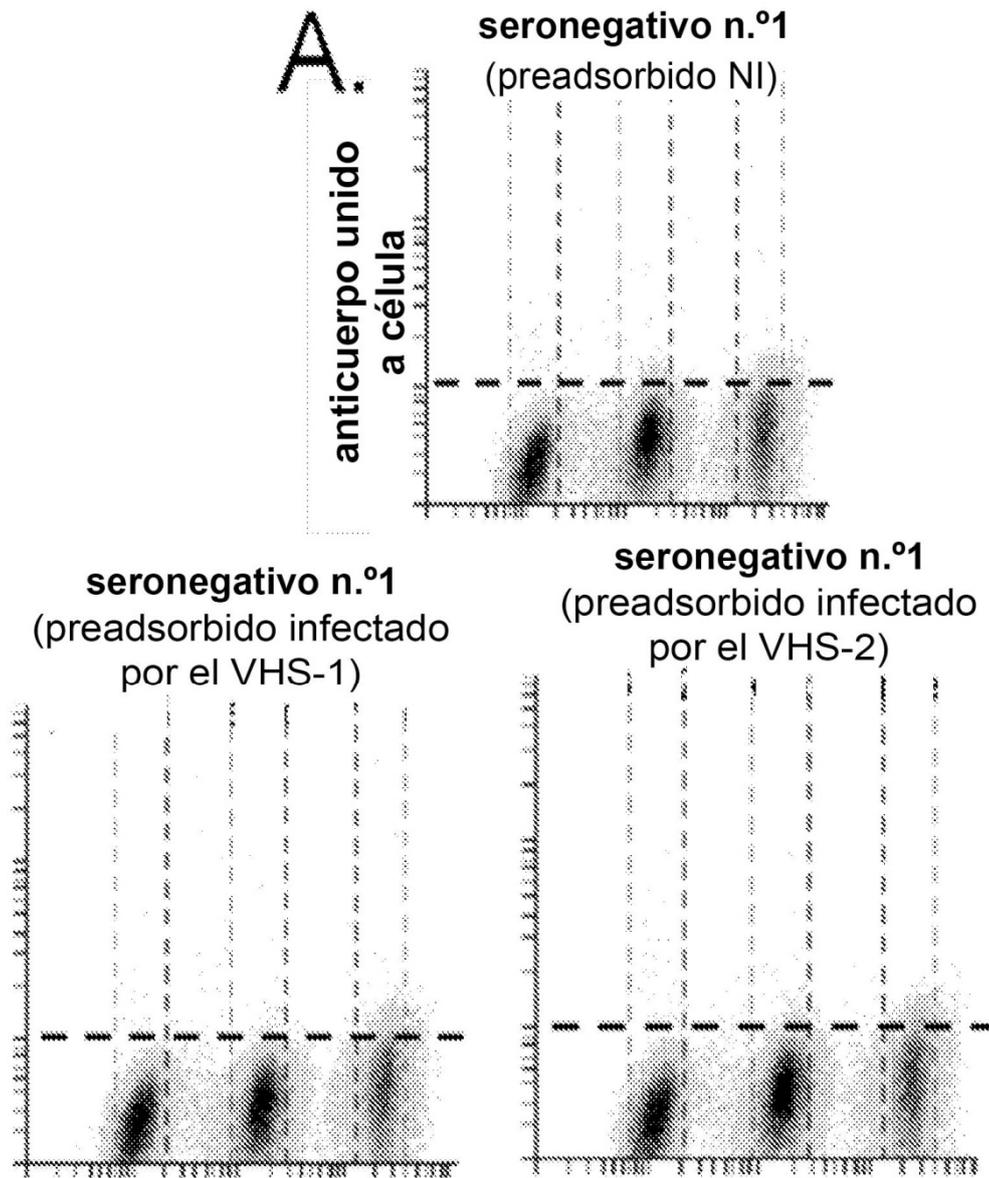
**FIG. 13**



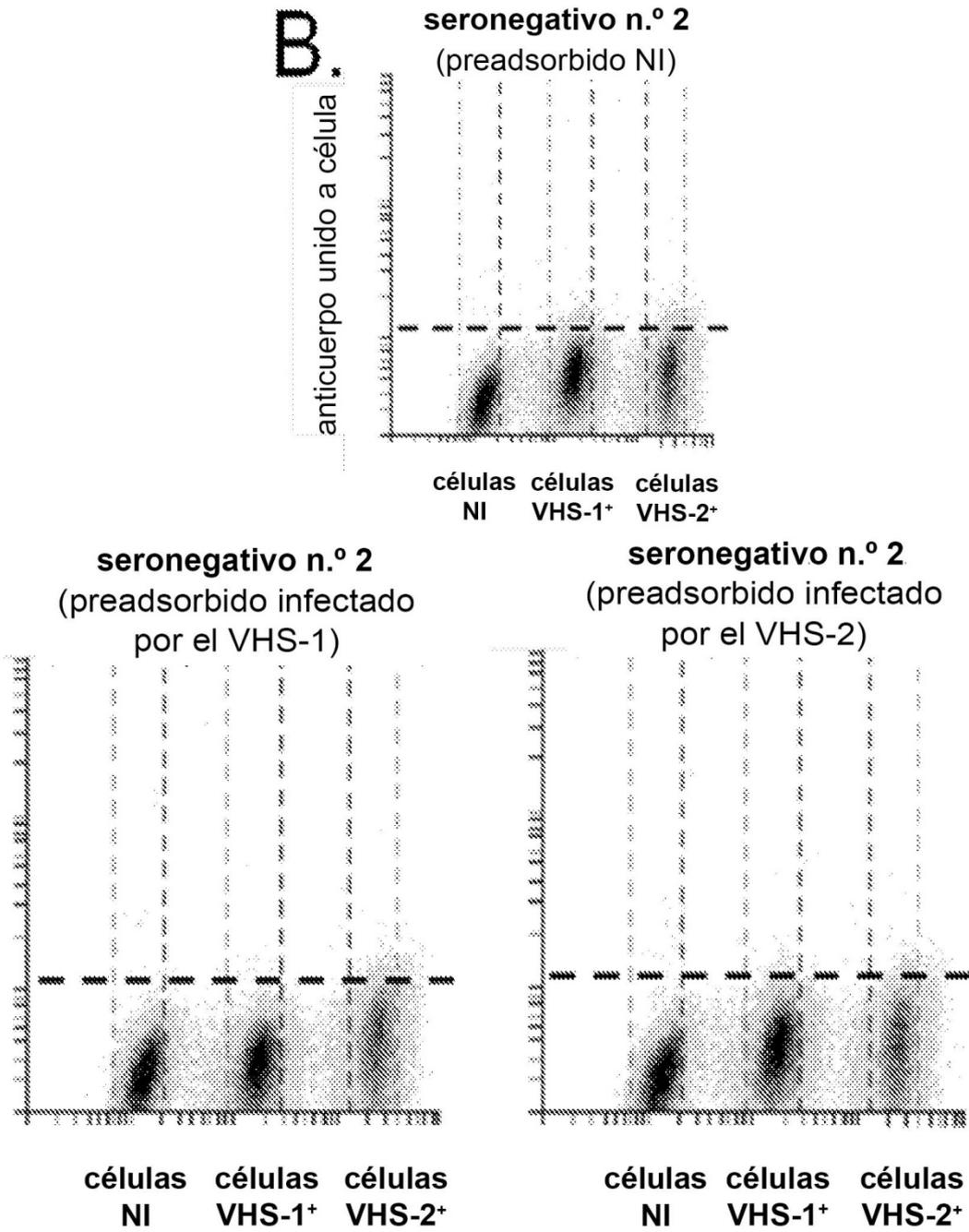
**FIG. 14**



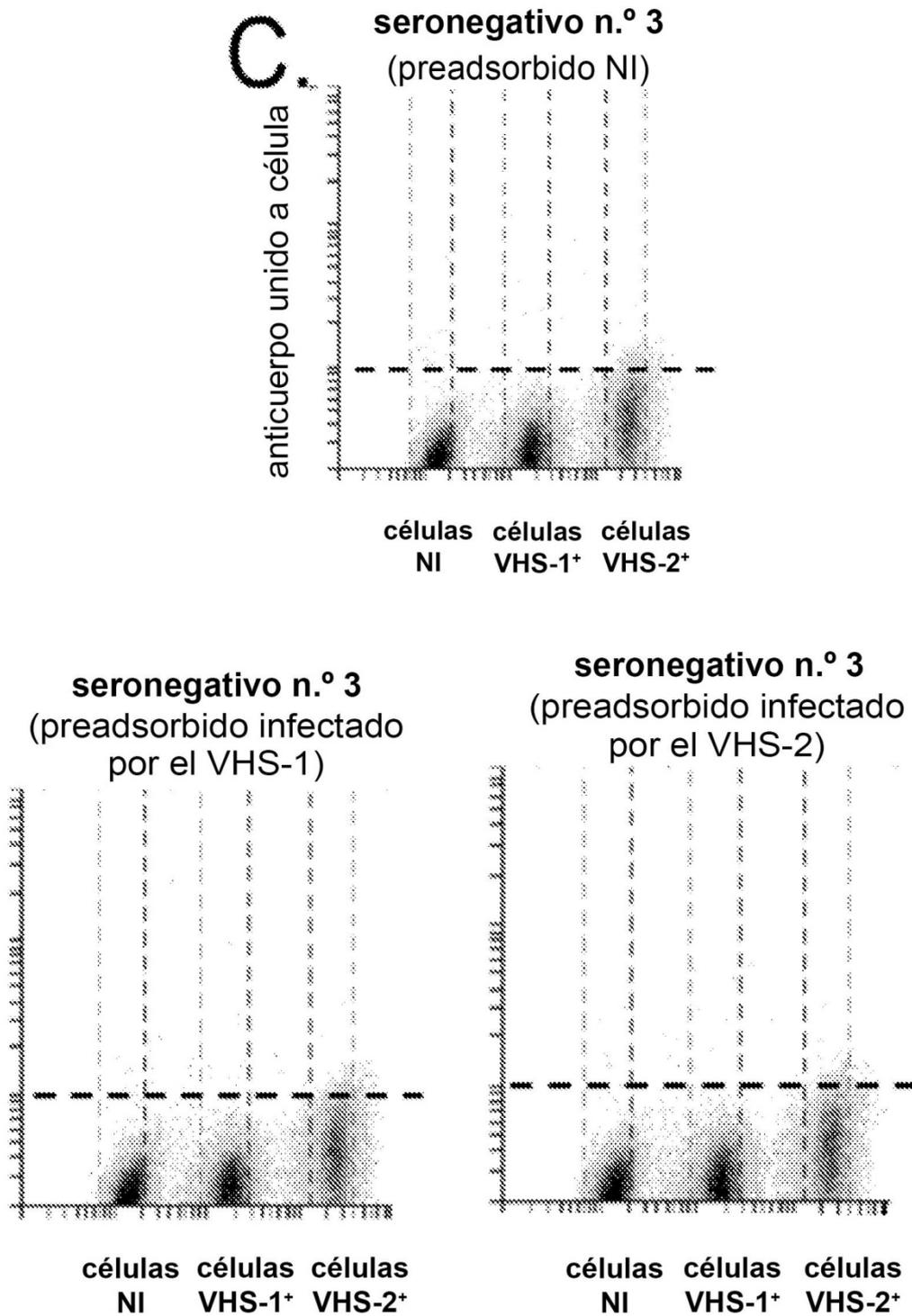
**FIG. 14 Cont.**



**FIG. 15**



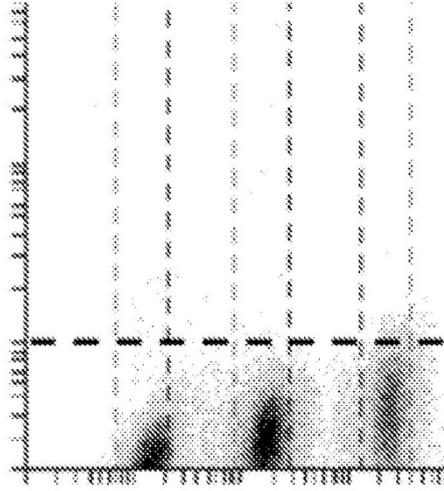
**FIG. 15 Cont.**



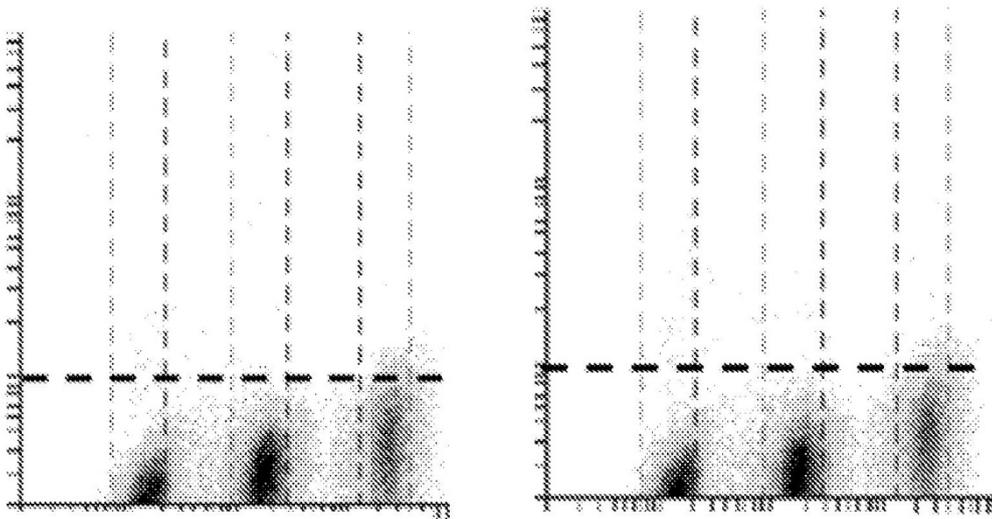
**FIG. 15 Cont.**

**D.**

anticuerpo unido a célula



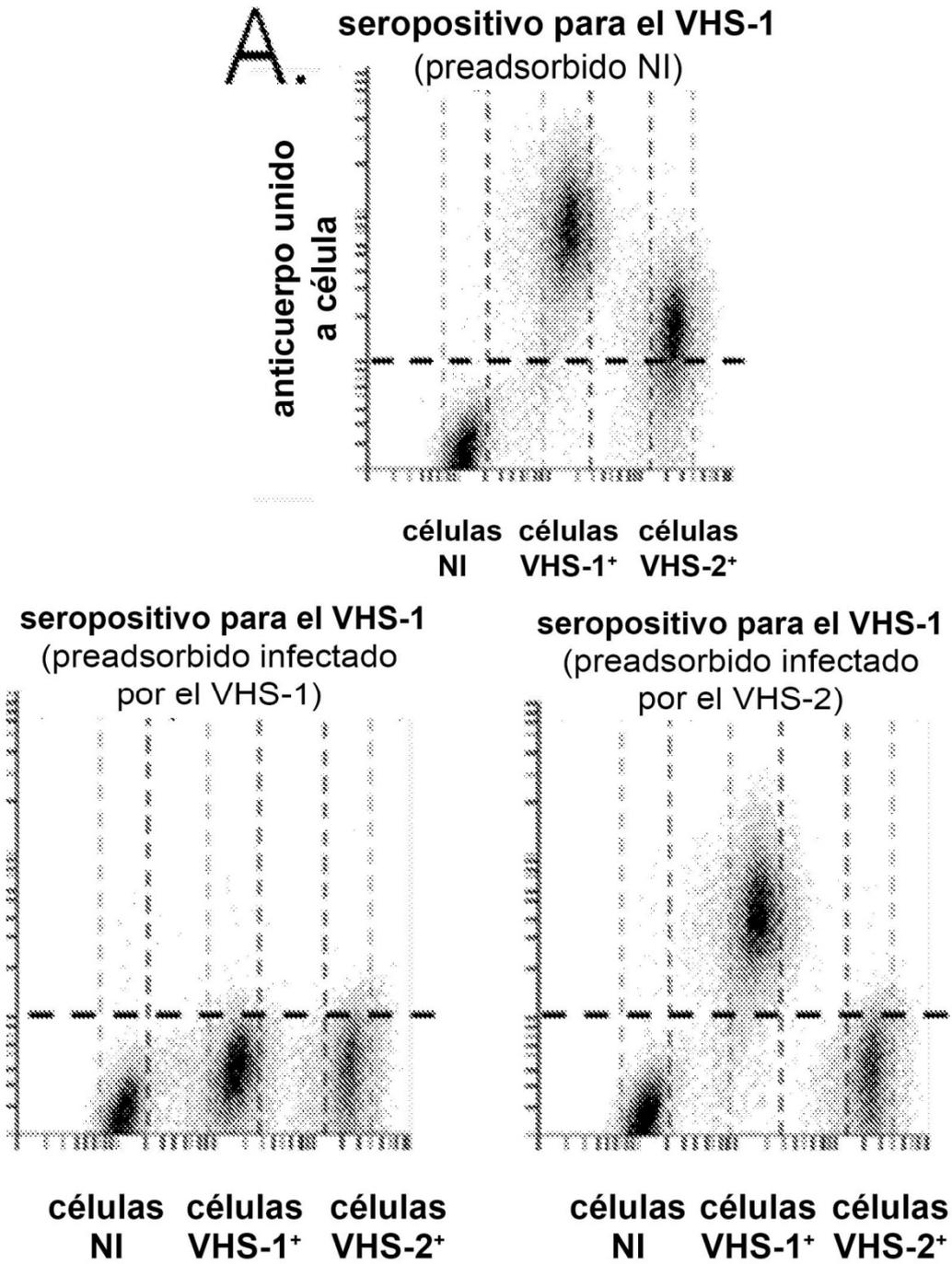
células NI    células VHS-1+    células VHS-2+



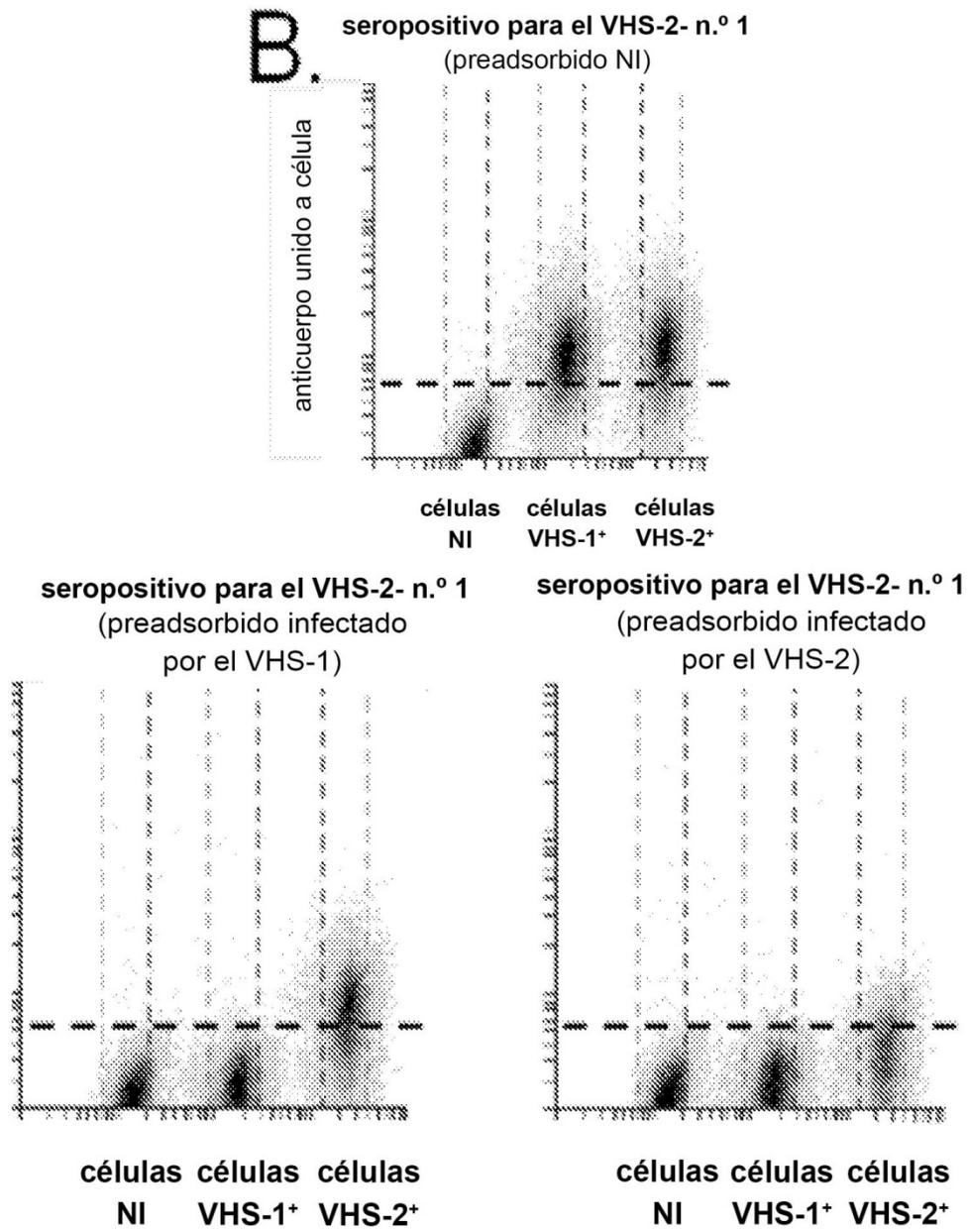
células NI    células VHS-1+    células VHS-2+

células NI    células VHS-1+    células VHS-2+

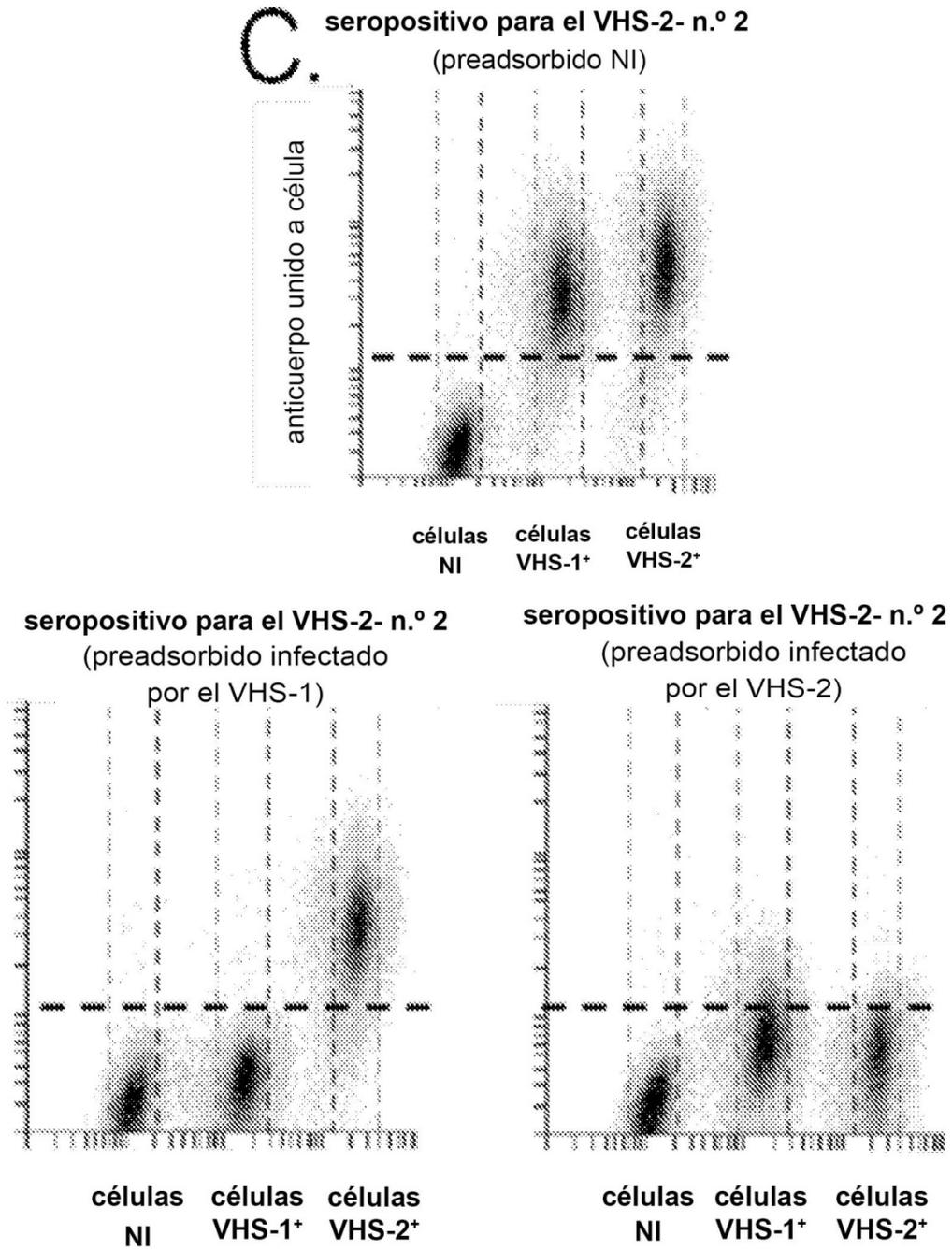
**FIG. 15 Cont.**



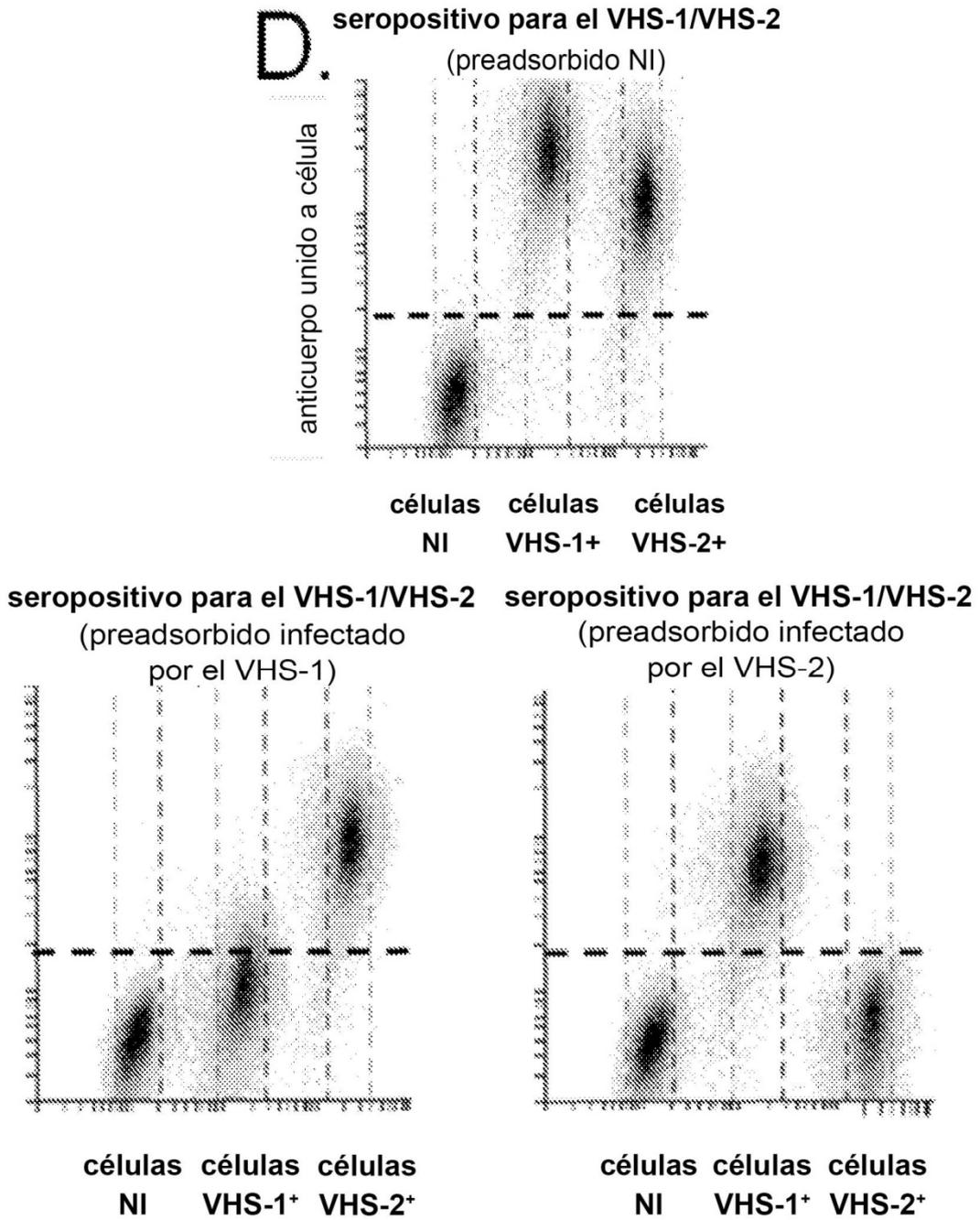
**FIG. 16**



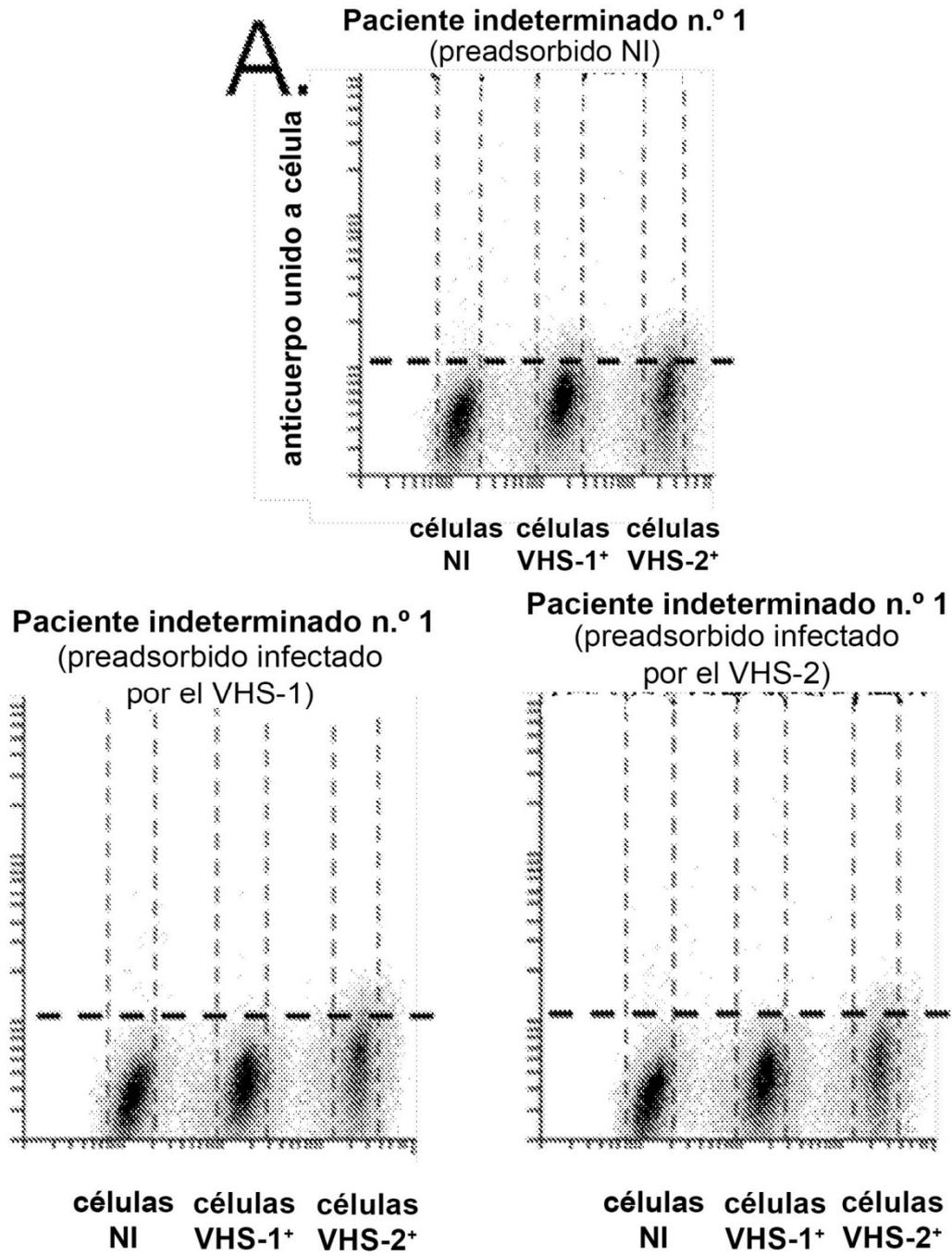
**FIG. 16 Cont.**



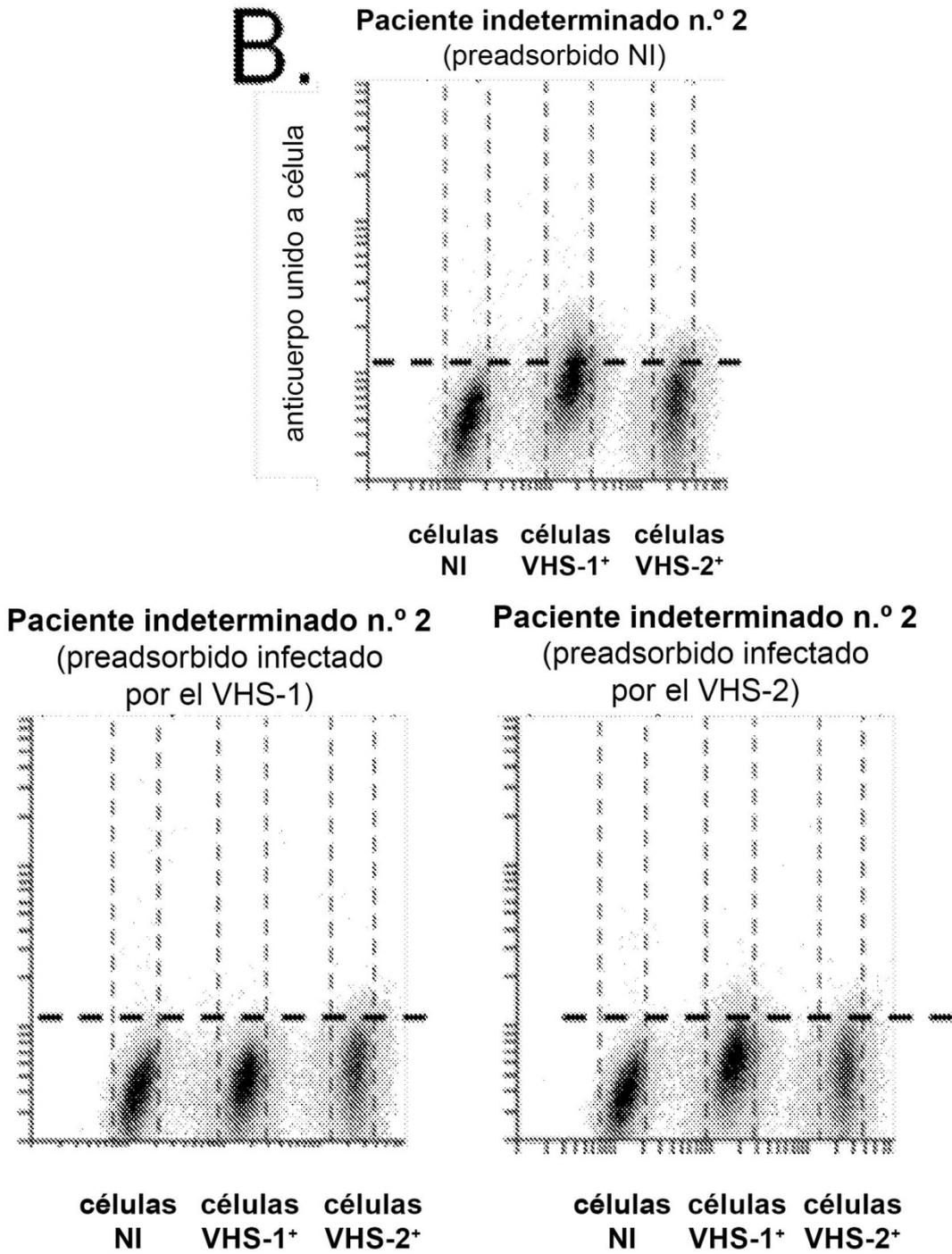
**FIG. 16 Cont.**



**FIG. 16 Cont.**

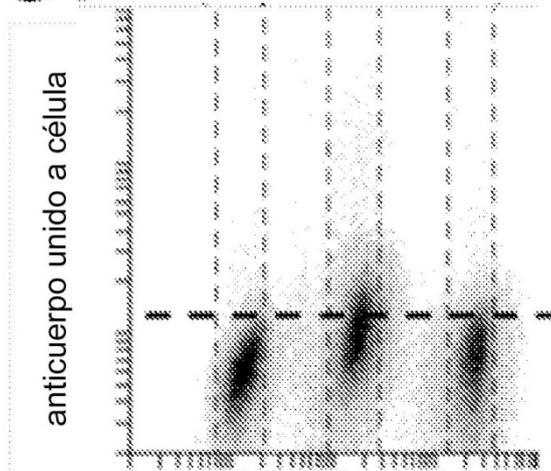


**FIG. 17**



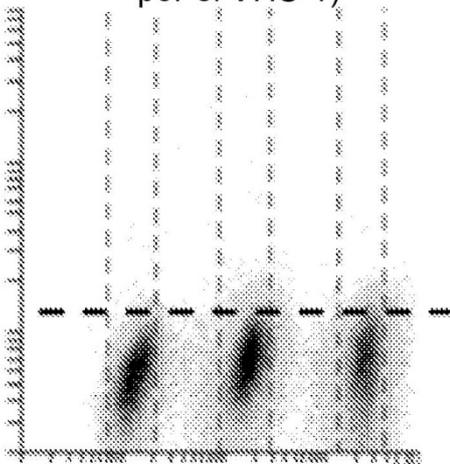
**FIG. 17 Cont.**

**C.** Paciente indeterminado n.º 3  
(preadsorbido NI)



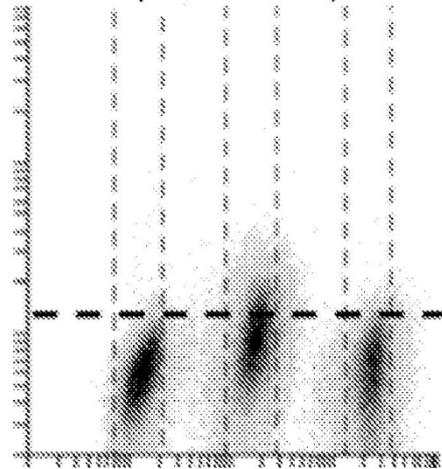
células NI    células VHS-1+    células VHS-2+

Paciente indeterminado n.º 3  
(preadsorbido infectado por el VHS-1)



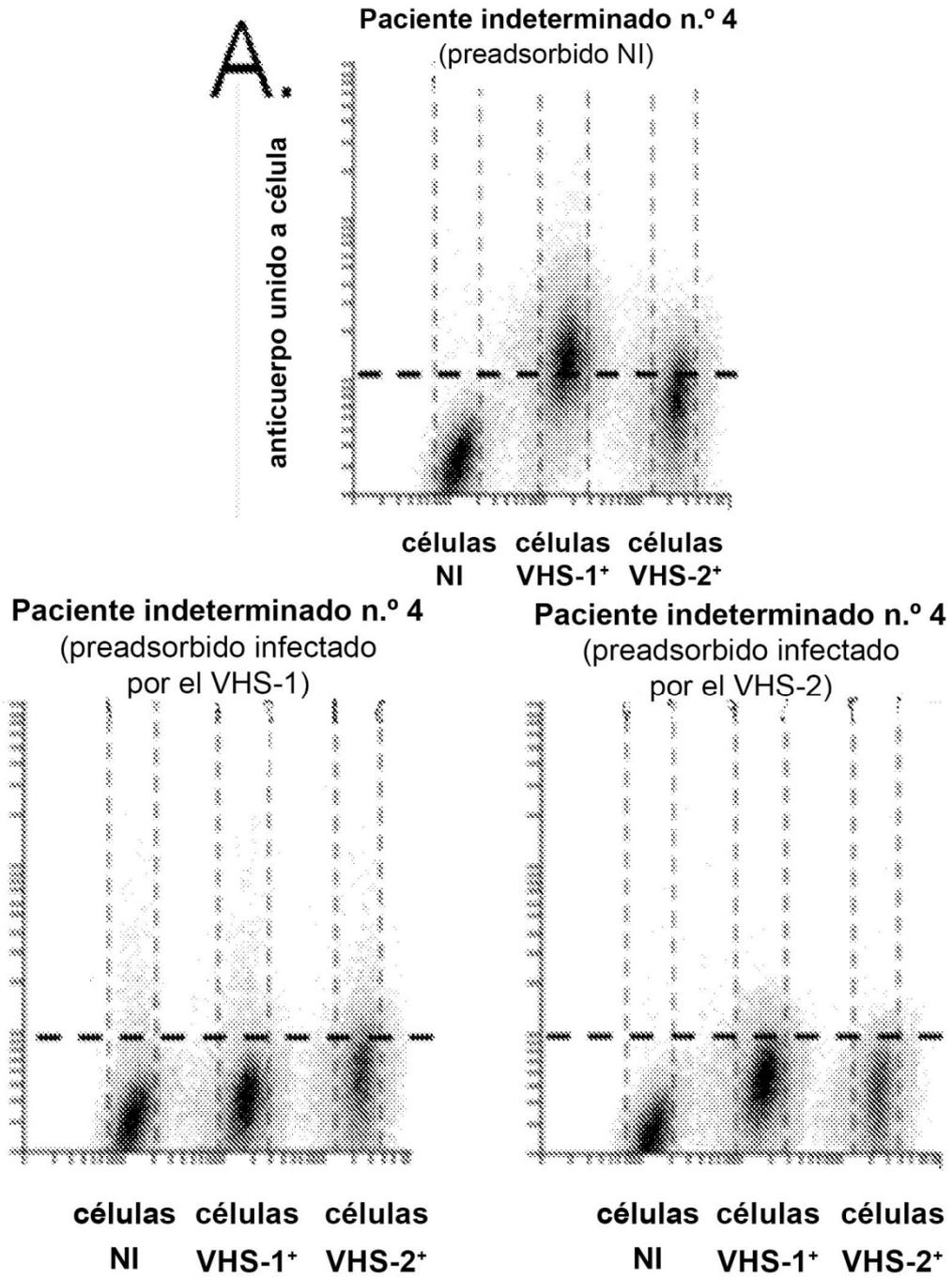
células NI    células VHS-1+    células VHS-2+

Paciente indeterminado n.º 3  
(preadsorbido infectado por el VHS-2)

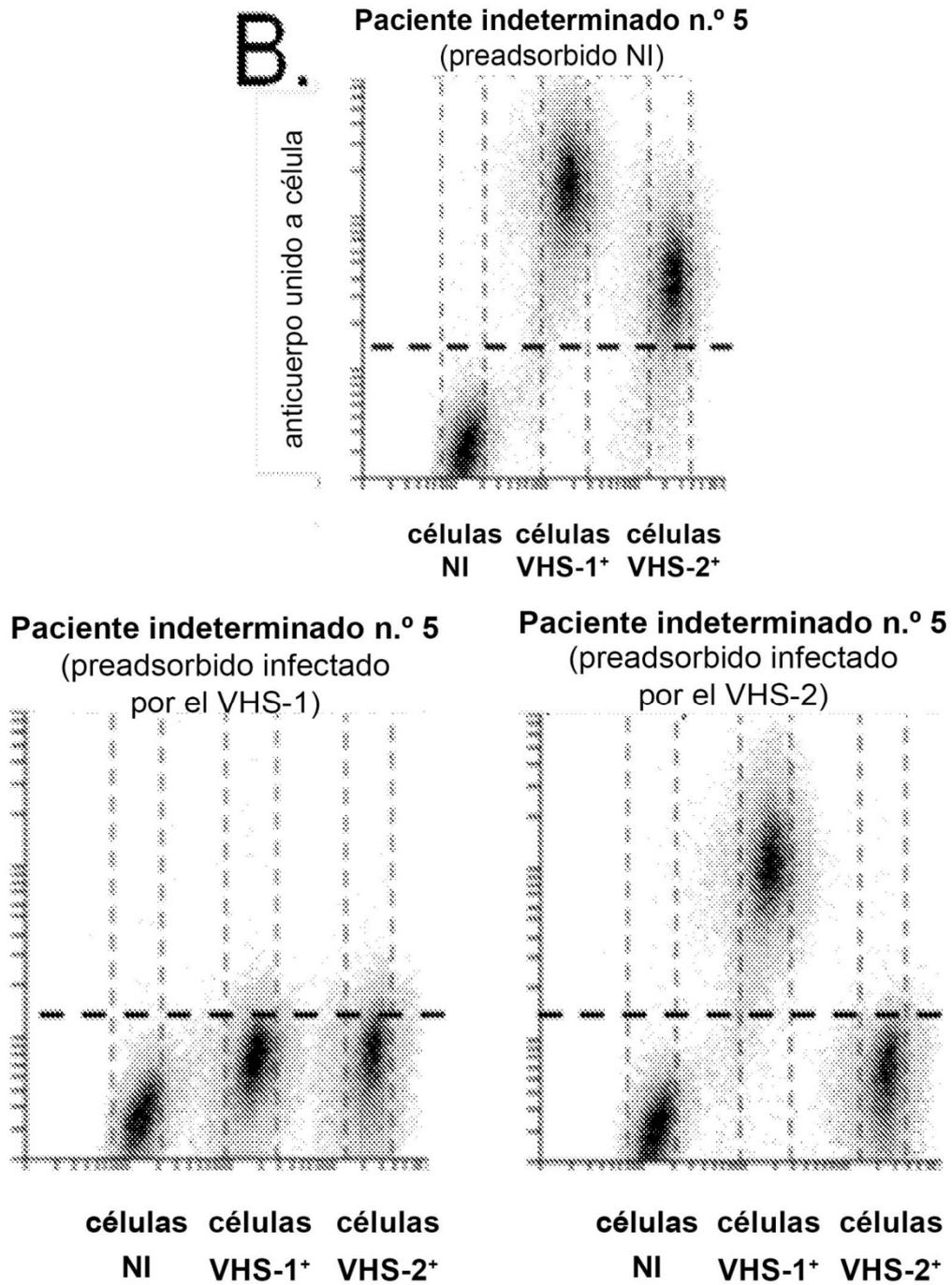


células NI    células VHS-1+    células VHS-2+

**FIG. 17 Cont.**



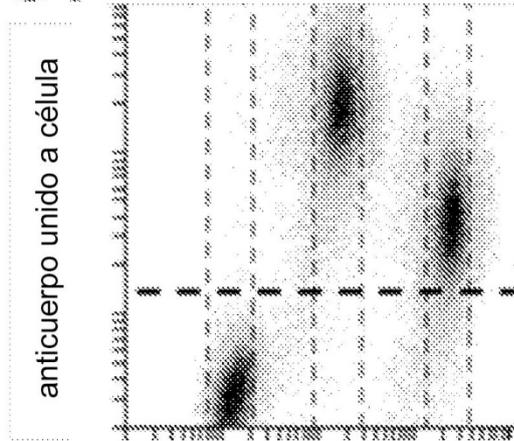
**FIG. 18**



**FIG. 18 Cont.**

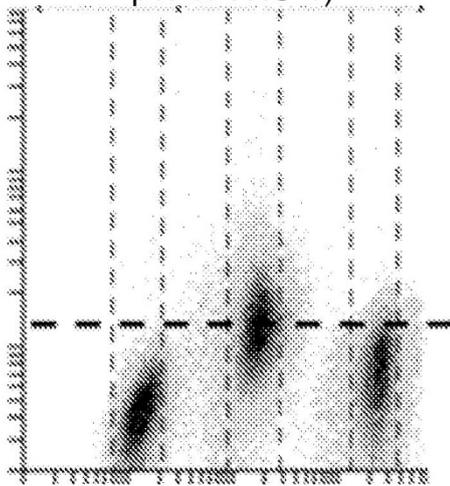
**C.**

**Paciente indeterminado n.º 6  
(preadsorbido NI)**



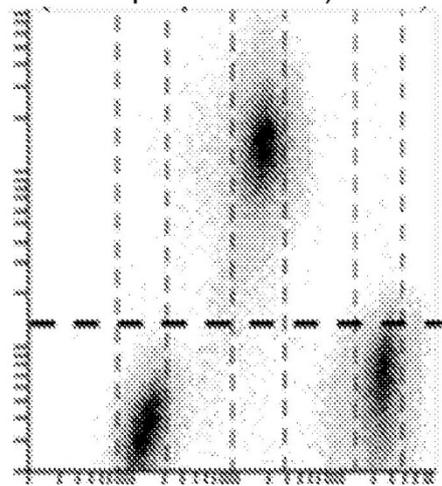
**células células células  
NI VHS-1+ VHS-2+**

**Paciente indeterminado n.º 6  
(preadsorbido infectado  
por el VHS-1)**



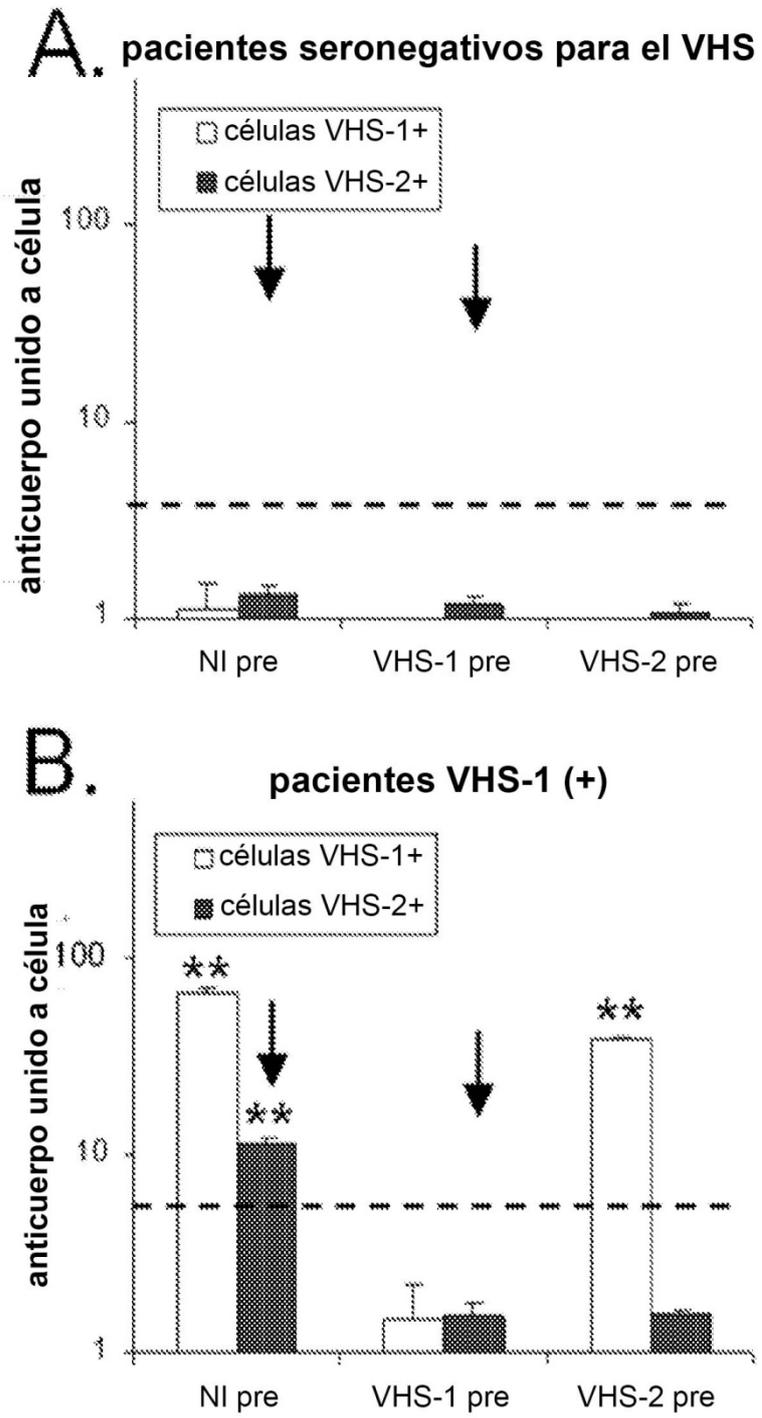
**células células células  
NI VHS-1+ VHS-2+**

**Paciente indeterminado n.º 6  
(preadsorbido infectado  
por el VHS-2)**

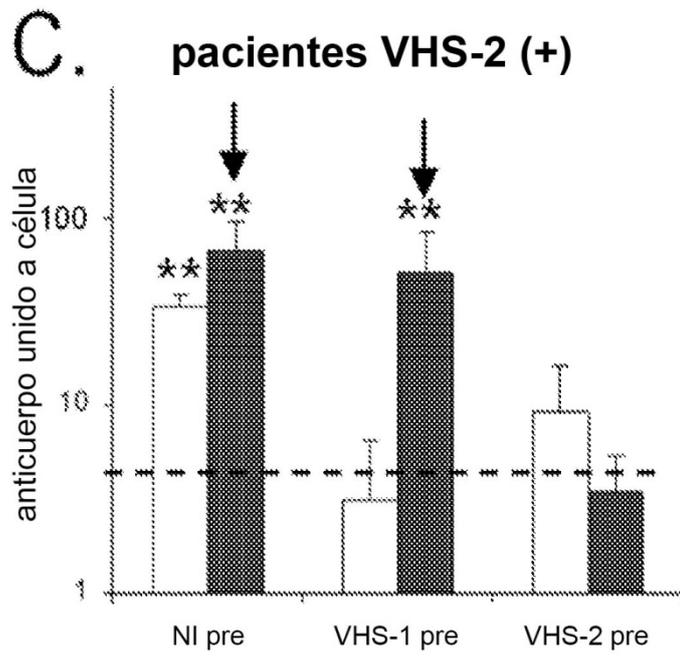


**células células células  
NI VHS-1+ VHS-2+**

**FIG. 18 Cont.**

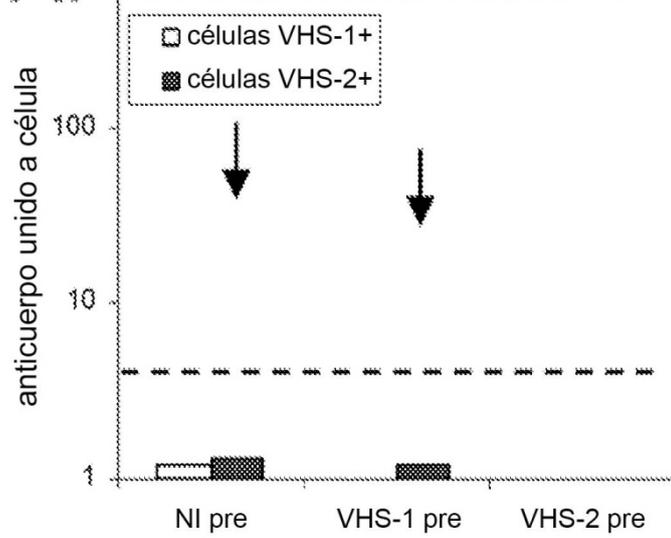


**FIG. 19**

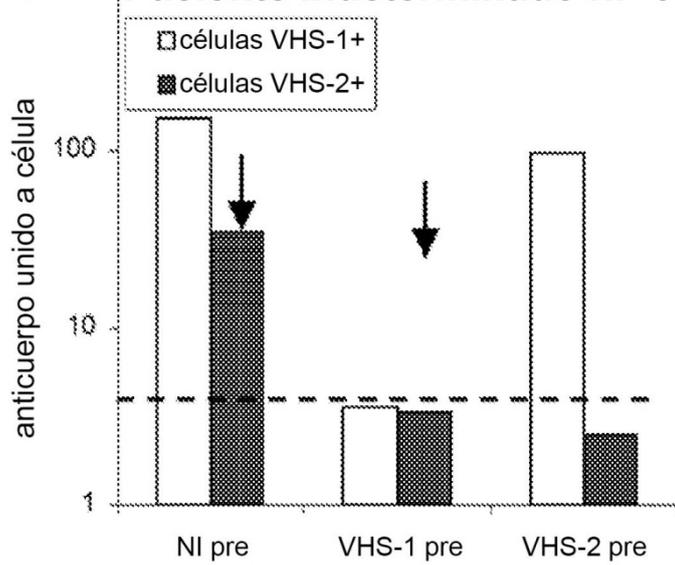


**FIG. 19 Cont.**

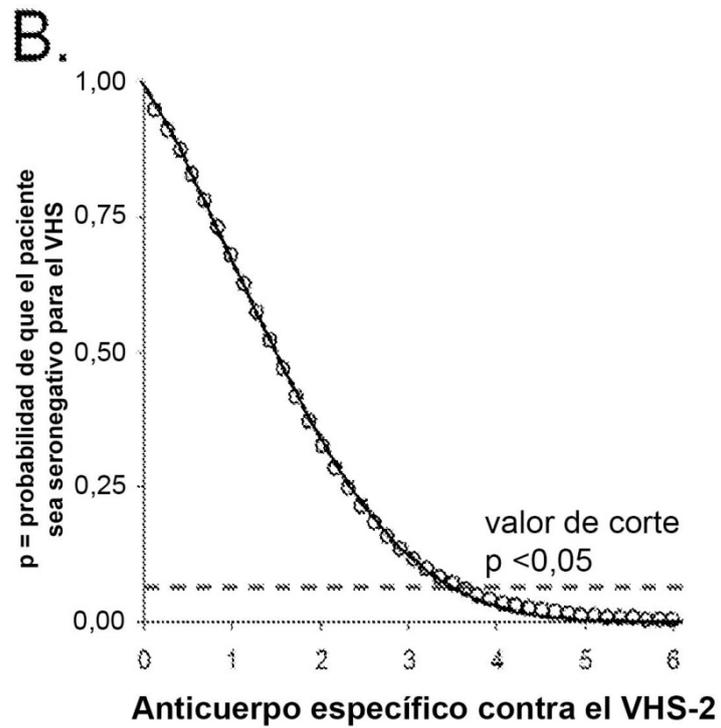
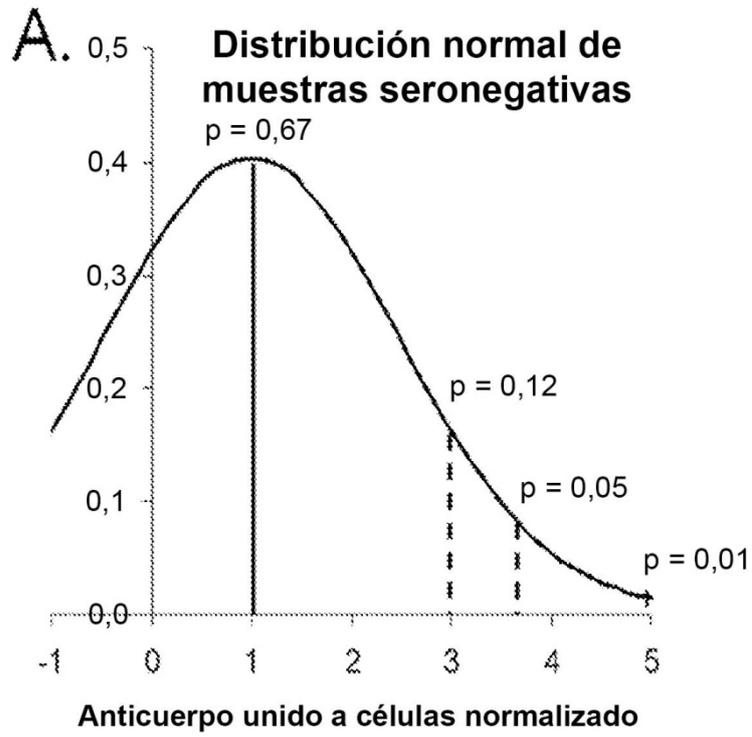
**A. Paciente indeterminado n.º 2**



**B. Paciente indeterminado n.º 6**



**FIG. 20**



**FIG. 21**

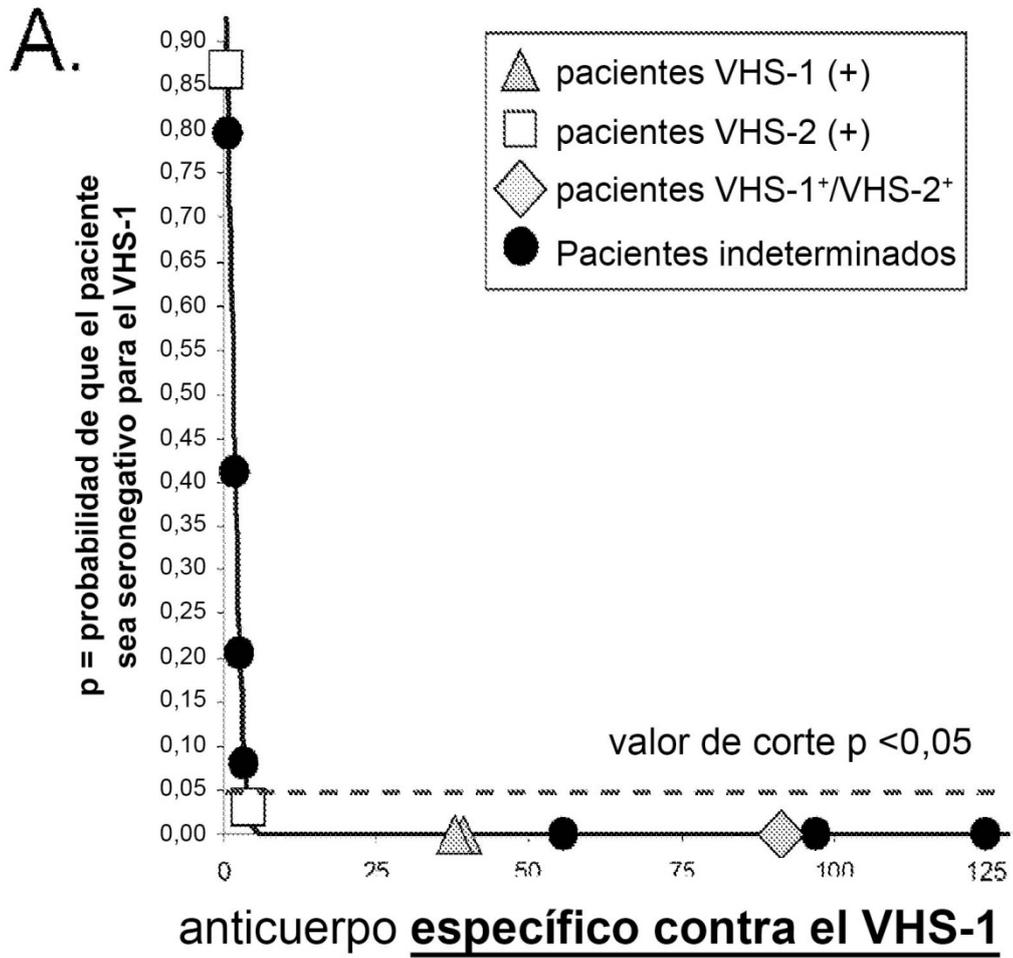
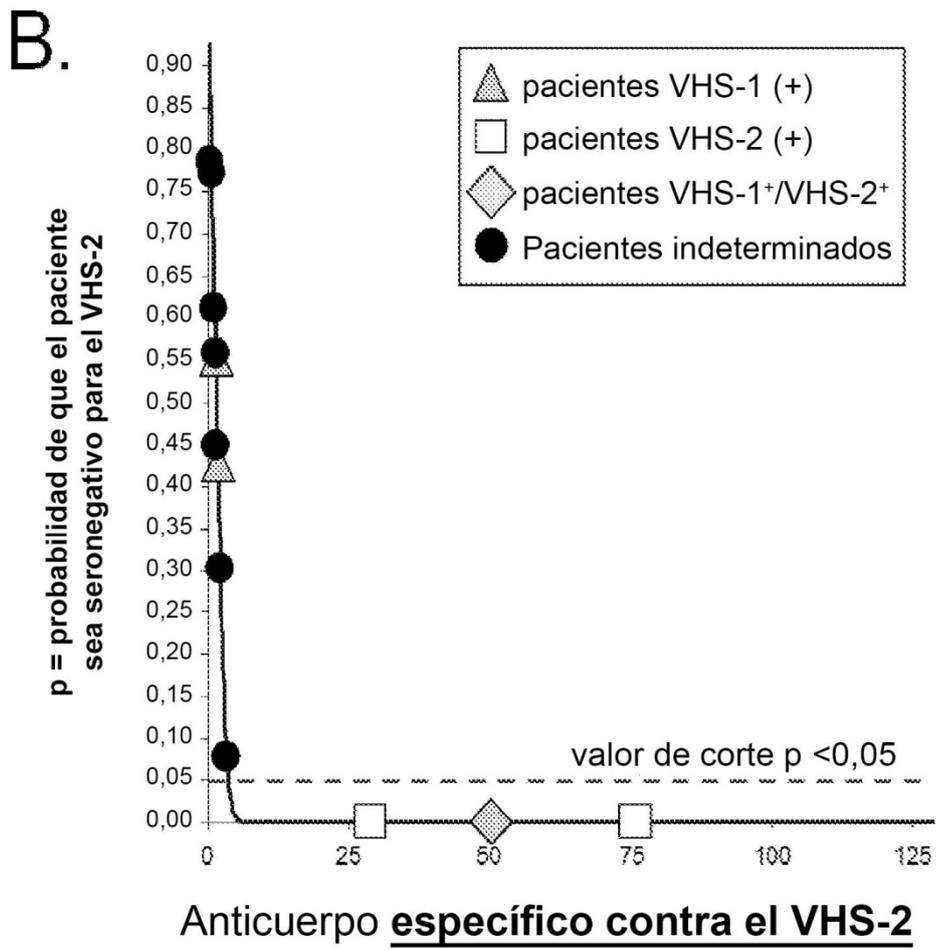
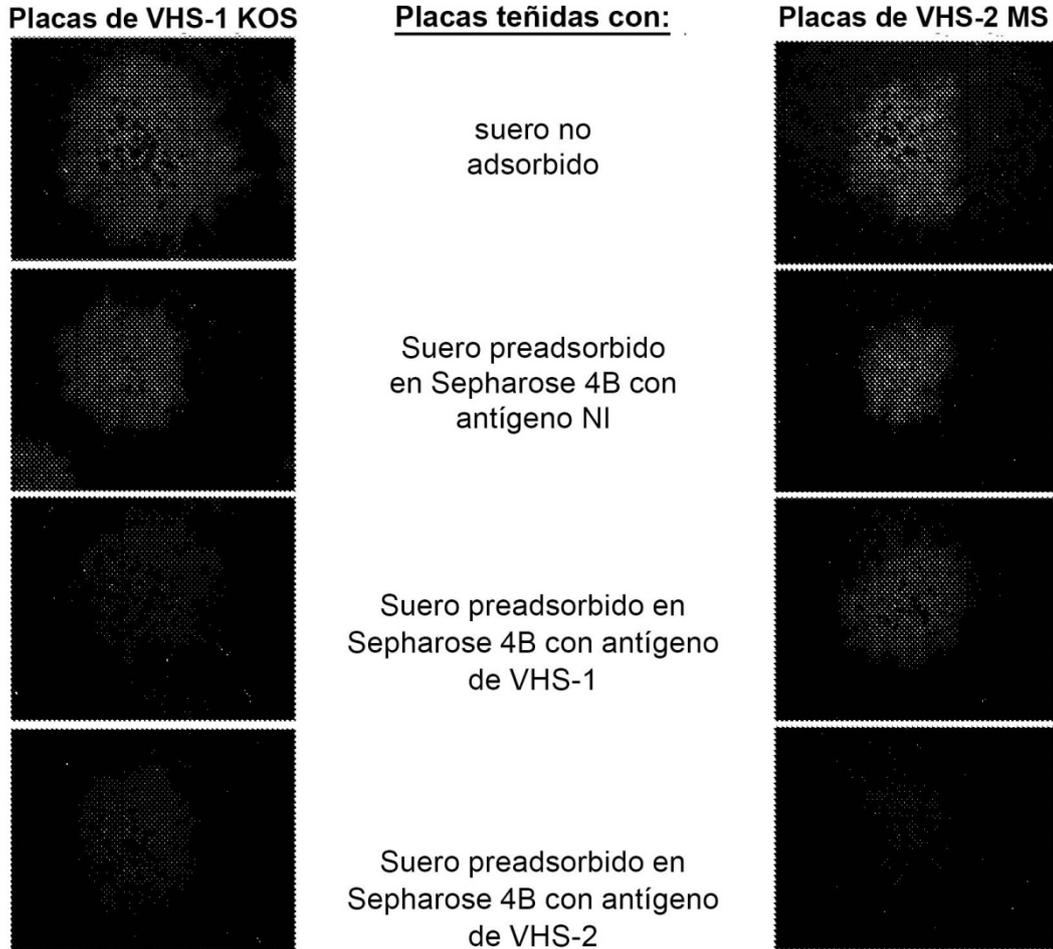


FIG. 22



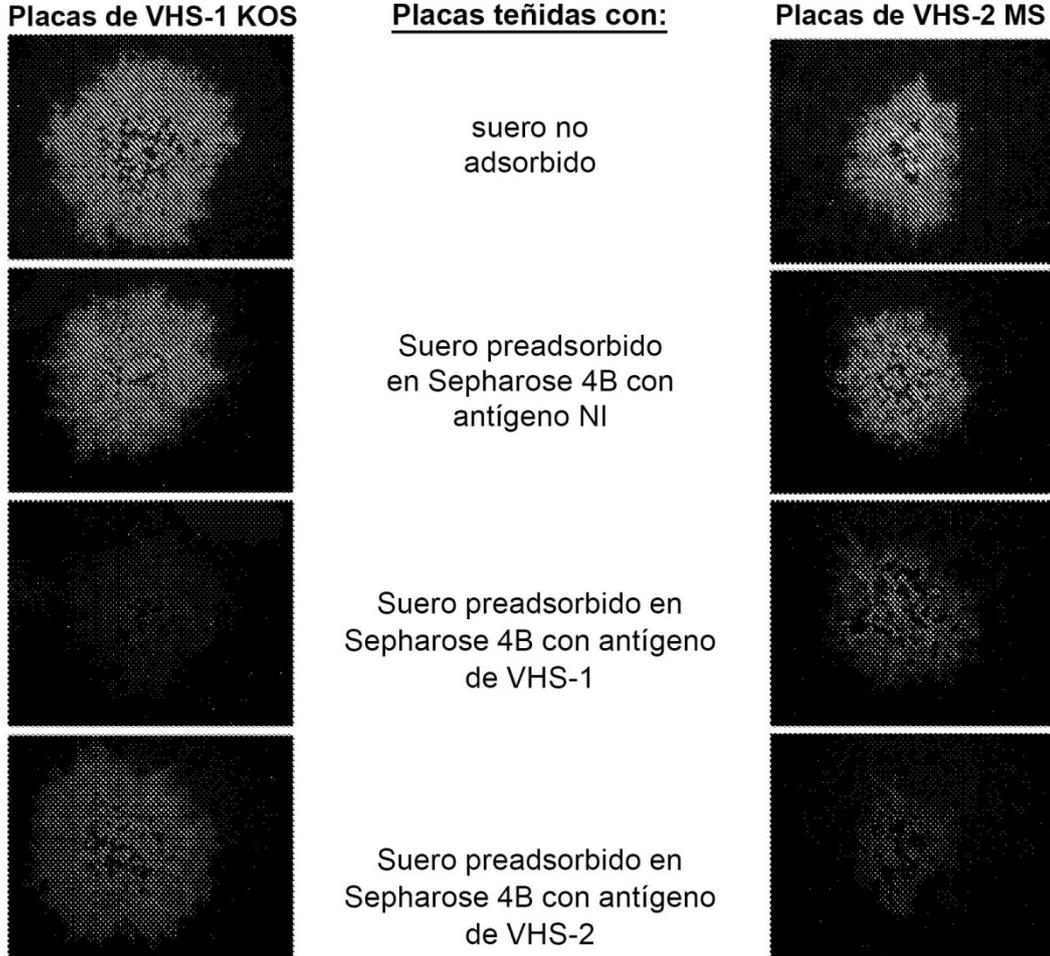
**FIG. 22 Cont.**

Placas únicas de VHS-1 o VHS-2 teñidas con una dilución 1:2000 de una **muestra de suero VHS-2+**, que se pre-adsorbió a una matriz de antígeno no infectado o de VHS-1+ o de VHS-2+.



**FIG. 23**

Placas únicas de VHS-1 o VHS-2 teñidas con una dilución 1:2000 de una **muestra de suero VHS-1+ y HSV-2+**, que se preadsorbió a una matriz de antígeno no infectado o de VHS-1+ o de VHS-2+.



**FIG. 24**