

LA INMUNODIFUSION DOBLE EN ESTUDIOS DE SEROEPIDEMIOLOGIA DE LOS VIRUS *HERPES SIMPLEX*¹

José Manuel Echevarría,² María Dolores Bermúdez de Castro,³
Enrique Nájera⁴ y Rafael Nájera⁵

Se realiza una encuesta serológica de anticuerpos frente a virus Herpes simplex, con las técnicas de neutralización, fijación de complemento e inmunodifusión doble. Se observa que esta última presenta resultados muy similares a los de la neutralización, y se considera la posibilidad de aplicarla en la detección de anticuerpos específicos de tipo.

Introducción

En los últimos años, se ha empleado la inmunodifusión doble (IDD) como una técnica para el estudio de la composición antigénica de los virus *Herpes simplex* (1-4); sin embargo, se ha prestado poca atención a su posible utilidad en la seroepidemiología o en el diagnóstico de infecciones recientes. Si se toma en cuenta que la IDD es una técnica de fácil realización y de resultados rápidos, en comparación con las pruebas de neutralización (NT) y fijación de complemento (FC), resulta de interés investigar el posible paralelismo con alguna de estas dos técnicas, con objeto de determinar su utilidad para los fines antes mencionados.

El presente trabajo tiene una doble intención: estudiar la distribución de anticuerpos neutralizantes, precipitantes y fijadores de complemento frente a los virus *Herpes simplex* en la población española y, por otra parte, comparar los resultados obtenidos por IDD con los de NT y FC.

Material y métodos

Virus y antígenos. Como antígeno para las pruebas de IDD, NT y FC se utilizó la cepa HFEM de *Herpes simplex* tipo 1, obtenida en Australia en 1937, y clonada tres veces consecutivas por Wildy en membrana corialantoidea de embrión de pollo en 1953.

Con el propósito de multiplicar el virus y obtener lotes de antígenos para IDD, NT y FC, se inoculó el virus sobre monocapas confluyentes de células BHK-21 cultivadas en frascos tipo Winchester, con dos horas de adsorción a 37°C; posteriormente, se completó con medio 199 hasta 200 ml. Cuando se observó efecto citopático generalizado (normalmente, entre 24 y 48 horas después) se separó a las células del vidrio con ayuda de un raspador de goma.

¹ Se publica también en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. 14, No. 1, 1980.

² Adjunto, Servicio de Virus Respiratorios, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid.

³ Jefe, Sección de Cultivos Celulares, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid.

⁴ Jefe, Servicio de Epidemiología, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid.

⁵ Jefe, Servicio de Virus Respiratorios, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid.

Luego se las centrifugó a 700 g/20 min, se volvieron a suspender en 2 ml de medio 199 y sonicadas 20 seg con 60 watts en un Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Co., Dandbury, Connecticut). Los extractos de células infectadas obtenidos de este modo se centrifugaron a 700 g/30 min para eliminar restos de membranas y el sobrenadante claro se empleó como antígeno en IDD y NT. Los antígenos para FC se prepararon a partir de estos extractos, por tratamiento con cloroformo al 5% en volumen, durante 20 horas de incubación a 4°C y centrifugación a 700 g/15 min. Todos los antígenos se almacenaron a -70°C, y se mantuvieron sin diluir hasta el momento de su uso.

Cultivos celulares. Como marcador en las pruebas de NT se utilizaron células VERO y, como medio de crecimiento, el Minimum Essential Medium de Eagle (MEM) en solución salina de Earle, con suero de ternera al 5% (Bio-Cult Laboratories, Escocia), 20,000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycin y 0.1 mg/ml de NaOH. Hasta su empleo en estas pruebas, los cultivos se mantuvieron por pases sucesivos, donde las células se dispersaron por tratamiento con solución de tripsina al 9.25% (Laboratorios Difco, 1:250) y EDTA al 0.02% en PBS, hasta el desprendimiento total de la monocapa. Para la producción de antígenos se utilizaron monocapas crecidas de células BHK-21. Para el crecimiento de estas células se usó el mismo medio antes descrito, con la única variante de la utilización de suero bovino fetal (Laboratorios Flow, Irvine, Escocia) en lugar del suero de ternera.

Pruebas de neutralización. Se realizaron mediante el micrométodo de Takatsy (1954) modificado por Sever (1962) (5), según las indicaciones de Kalter en 1973 (6). Como soportes para las pruebas, se utilizaron microplacas para cultivos celulares tipo Cook Microtitter (C.A. Greiner, Alemania) preesterilizadas. Los sueros se titularon sin inactivación previa (figura 1).

Pruebas de fijación de complemento. Se siguió la técnica de Grist (1974) (7), modificación de la descrita por Bradstreet y Taylor (1962) (8). Se utilizaron placas en U de Linbro Scientific Co. Inc. (Hamden, Connecticut) modelo IS-MAC-96.

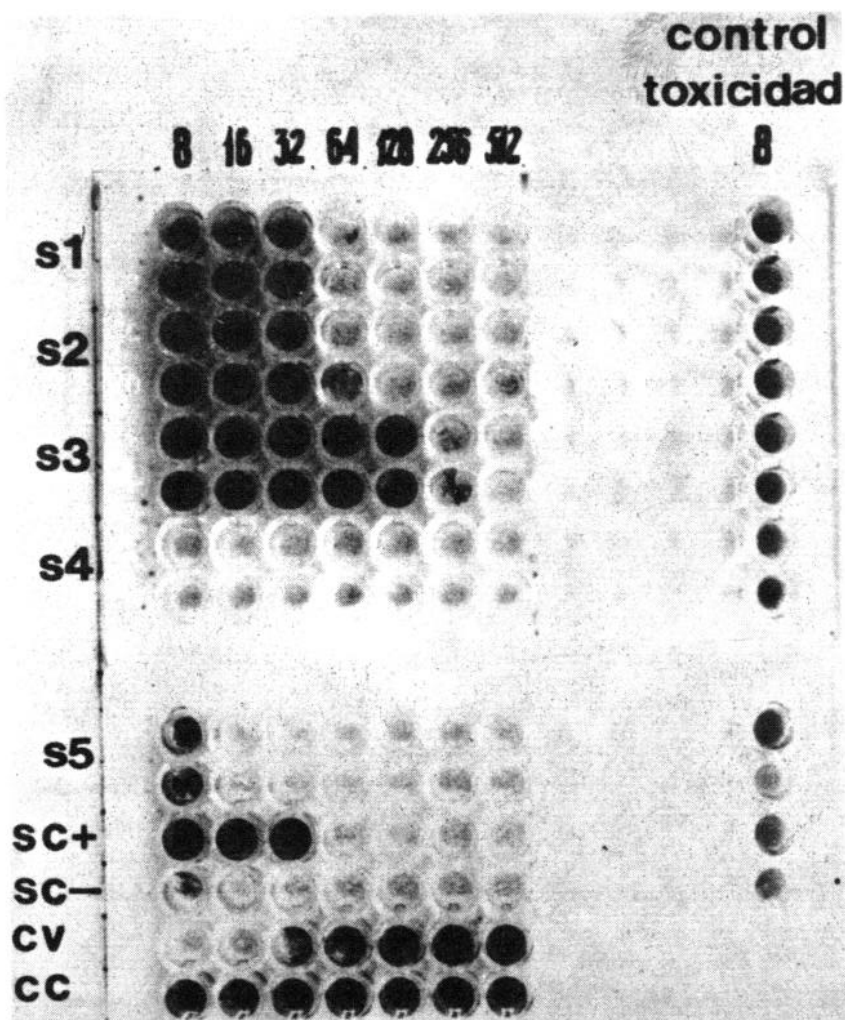
Pruebas de inmunodifusión doble. Se realizaron sobre placas de vidrio de 9 × 8 cm y portas de plástico de 7 × 2 cm (División Travenol Laboratories Inc., California). El gel utilizado fue una suspensión de Ionagar (Laboratorios Difco) al 1% en agua destilada, con C1Na al 0.9% y azida de sodio al 0.1%; la altura de la capa de gel en las placas fue de 2 mm.

Los sueros se analizaron en pocillos de 4 mm de diámetro, dispuestos en forma regular en grupos de cuatro o de seis, alrededor de un pocillo central de las mismas dimensiones, en el que se inoculó el antígeno, con una distancia de 2 mm entre el borde del pocillo central y los de los pocillos periféricos.

Los pocillos se inocularon con 30 μ l de suero o antígeno, se dejó difundir un tanto el antígeno y se añadieron 25 μ l de solución de lauril sarcosinato sódico al 2% en agua destilada, en cada pocillo de antígeno. Después de 48 horas de desarrollo a temperatura ambiente y en cámara húmeda, las placas se lavaron por inmersión en solución de C1Na al 0.85% durante 24 a 48 horas. A continuación, se tiñeron por inmersión en solución de negro amido al 1% en agua destilada (preparado con ácido acético glacial al 6% y acetato sódico al 1.36%), durante cinco minutos; el exceso de colorante se eliminó por lavado en ácido acético glacial al 5% en agua destilada durante 24 horas.

En cada prueba se incorporaron controles de suero positivo, suero negativo y antígeno. Este antígeno control se preparó a partir de cultivos de células BHK-21 no infectadas, según el mismo método para la preparación de los extractos de células infectadas que se usaron como antígeno en IDD (figura 2).

FIGURA 1—Microneutralización VHS.



Sueros utilizados. Para la realización de la encuesta se seleccionó un total de 511 sueros de individuos sanos o de enfermos con procesos no herpéticos, de entre las muestras clínicas recibidas en el Servicio de Virus Respiratorios, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Madrid, desde 1974 a 1976. Dichos sueros, procedentes de varias provincias españolas, se almacenaron a -20°C en el momento de su recepción hasta su uso en la encuesta y se dividieron en doce grupos de edades, tal como se describen en el cuadro 1.

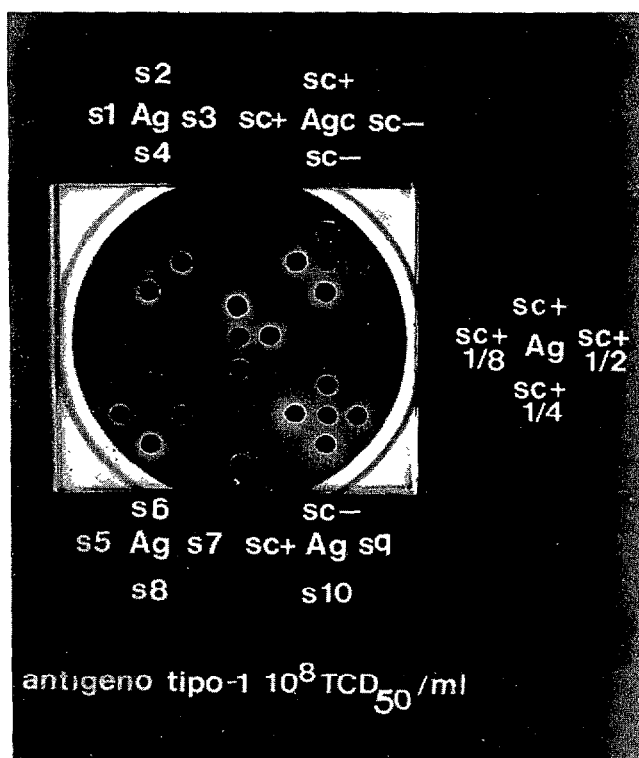
Resultados

Los resultados obtenidos por NT e IDD se presentan en el cuadro 1. La representación gráfica de estos resultados (figura 3)

indica que, tras un decrecimiento en el porcentaje de positividad durante los primeros 7 a 9 meses de vida, la curva asciende en forma rápida hasta los 5 a 10 años de edad, y una subida más lenta entre este grupo y el de 15 a 20 años. A partir de esta edad la curva asciende muy lentamente, hasta alcanzar un 85 a 95% de posibilidad en el último grupo de edad.

De los sueros que resultaron positivos en IDD, el 66% dio una única línea de precipitación y un 44% dio dos líneas. De este 44% que mostró doble línea, solo el 19% corresponde a sueros comprendidos entre los 6 meses y los 15 años de edad, estando incluido el 81% restante en el grupo de 0 a 6 meses y en el de mayores de 15 años. Estos resultados se consignan en el cuadro 2 y se representan en forma gráfica en la figura 4.

FIGURA 2—Inmunodifusión doble VHS.



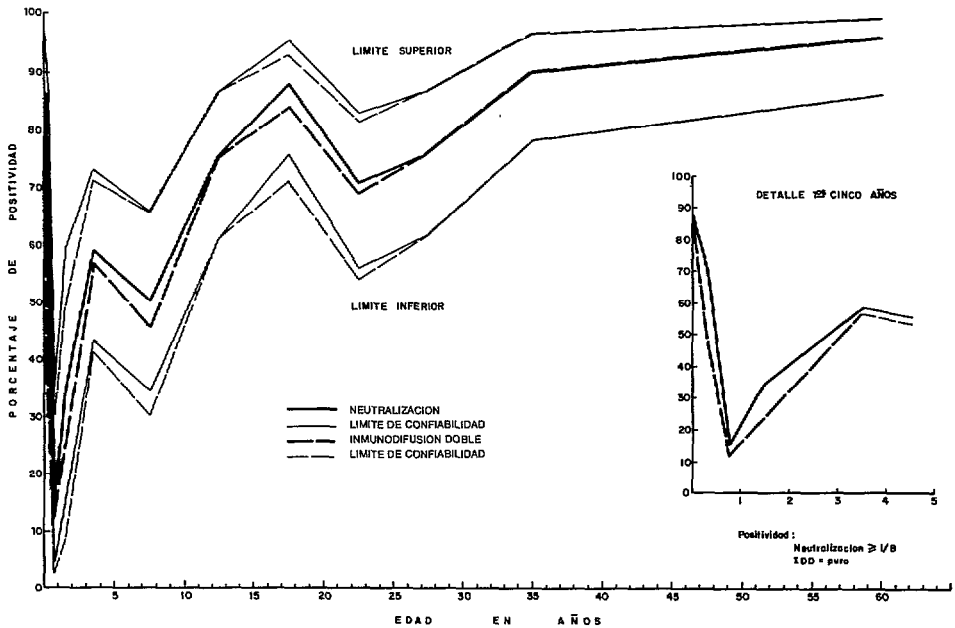
Los resultados obtenidos por FC se presentan en el cuadro 3; la curva de positividad (figura 5) presenta decrecimiento muy

rápido en los primeros 6 a 12 meses de vida, con un 8% de positividad en este grupo para subir de nuevo con rapidez,

CUADRO 1—Porcentajes de positividad en NT e IDD por grupos de edad.

Edad	No. de sueros	Positivos NT		Positivos IDD		% positivos NT (Límites de confiabilidad 95%)		% positivos IDD (Límites de confiabilidad 95%)	
		No.	%	No.	%				
0-1 mes	49	42	85.6	40	81.6	72.8	94.1	70.0	91.2
1-6 meses	31	22	71.0	15	48.4	52.0	85.8	31.1	67.0
6-12 meses	26	4	15.5	3	11.5	4.3	34.9	2.4	30.1
1-2 años	20	7	35.0	5	25.0	15.3	59.2	8.6	49.1
2-5 años	46	27	58.7	26	56.5	43.2	73.0	41.1	71.1
5-10 años	42	21	50.0	19	45.2	34.2	65.8	29.8	65.3
10-15 años	49	37	75.5	37	75.5	61.1	86.6	61.1	86.6
15-20 años	50	44	88.0	42	84.0	75.7	95.5	70.9	92.8
20-25 años	48	34	70.8	33	68.8	55.9	83.0	53.7	81.3
25-30 años	50	38	76.0	38	76.0	61.8	86.9	61.8	86.9
30-40 años	50	45	90.0	45	90.0	78.2	96.7	78.2	96.7
40-80 años	50	48	96.0	48	96.0	86.3	99.5	86.3	99.5
Total	511	369	72.2%	351	68.7%				

FIGURA 3—Distribución por edad y límites de confiabilidad (P=0.95) de 512 sueros, por NT e IDD.



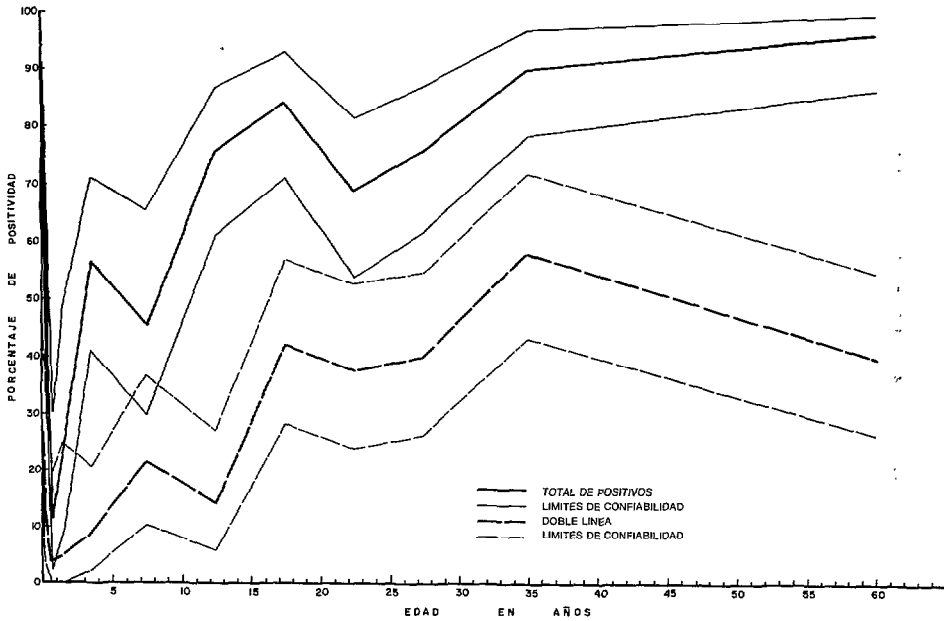
Hasta alcanzar alrededor de un 40% en el grupo de 2 a 5 años. Este porcentaje se mantiene hasta los 10 a 15 años, para descender otra vez con suavidad, y alcanzar alrededor de un 20% en el grupo de 20 a 25 años. A partir de este momento, la

curva asciende con lentitud, para situarse alrededor del 50% de positividad en edades superiores a los 30 años. Este porcentaje es comparable al 60% de positividad que se observó durante el primer mes de vida (cuadro 3 y figura 5).

CUADRO 2—Porcentajes de positividad en IDD por grupos de edad (positivos y línea doble).

Edad	No. de sueros	IDD positivos		Límites de confiabilidad 95%		Doble línea IDD		Límites de confiabilidad 95%	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0-1 mes	49	40	81.6	70.0	91.2	16	32.6	19.9	47.5
1-6 meses	31	15	48.4	30.1	67.0	4	12.9	3.6	29.8
6-12 meses	26	3	11.5	2.4	30.1	1	3.8	0.1	19.6
1-2 años	20	5	25.0	8.6	49.1	1	5.0	0.1	24.9
2-5 años	46	26	56.5	41.1	71.1	5	8.7	2.4	20.8
5-10 años	42	19	45.2	29.8	65.3	9	21.4	10.3	36.8
10-15 años	49	37	75.5	61.1	86.6	7	14.3	5.9	27.2
15-20 años	50	42	84.0	70.9	92.8	21	42.0	28.2	56.8
20-25 años	48	33	68.8	53.7	81.3	18	37.5	24.0	52.6
25-30 años	50	38	76.0	61.8	86.9	20	40.0	26.4	54.8
30-40 años	50	45	90.0	78.2	96.7	29	58.0	43.2	71.8
40-80 años	50	48	96.0	86.3	99.5	20	40.0	26.4	54.8
Total	511	351	68.7			151	29.5		

FIGURA 4—Distribución por edad y límites de confiabilidad ($P=0.95$) de 512 sueros, por IDD: total de positivos y doble línea.



Discusión

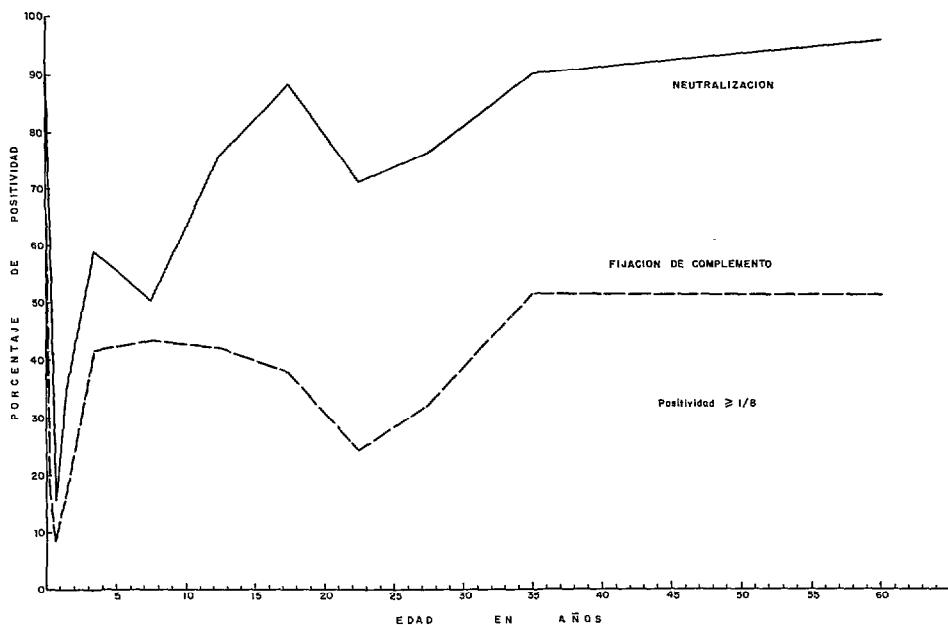
Las curvas obtenidas mediante las técnicas de NT e IDD presentan un claro paralelismo, y son prácticamente superponibles, tal como se aprecia al calcular los

límites de los resultados con el 95% de confiabilidad. Las diferencias que se pueden observar en el cuadro 1, entre el número de sueros positivos para cada técnica en cada uno de los grupos de edad no son significativos desde el punto de vista estadístico.

CUADRO 3—Porcentajes de positividad en FC por grupos de edad.

Edad	No. de sueros	Positivos		Límites de confiabilidad 95%	
		No.	%		
0-1 mes	48	30	62.5	47.3	76.0
1-6 meses	31	6	19.3	7.4	37.5
6-12 meses	24	2	8.3	1.0	27.0
1-2 años	19	3	15.8	3.4	39.5
2-5 años	46	19	41.3	27.0	56.7
5-10 años	42	18	42.9	27.7	59.0
10-15 años	48	20	41.7	27.6	56.8
15-20 años	48	18	37.5	24.0	52.6
20-25 años	46	11	24.0	12.6	38.8
25-30 años	47	15	32.0	19.0	47.1
30-40 años	43	22	51.2	35.5	66.7
40-80 años	45	23	51.1	35.8	66.3
Total	487	187	38.4		

FIGURA 5—Distribución por edad de 512 sueros, por NT y FC.



Caba destacar que el grupo en donde estas diferencias son más acusadas, corresponde al de 1 a 6 meses de edad, período en el que los anticuerpos adquiridos de la madre están en desaparición y en el que se detecta el mayor porcentaje de títulos neutralizantes de 1:8 o inferiores. Estos resultados indican en forma clara que las pruebas de neutralización e inmunodifusión doble poseen un nivel de precisión muy similar, ya que se pueden detectar como positivos en IDD todos aquellos sueros con un título neutralizante de 1:8 como mínimo. Es por ello que la IDD puede constituirse en una técnica útil, para la realización de estudios seroepidemiológicos de virus *Herpes simplex*. Asimismo, su uso para el diagnóstico de laboratorio, en infecciones recientes de estos virus, presenta la ventaja de una mayor sencillez de realización e instrumentación, con respecto a la prueba de neutralización, que requiere material esterilizado y el mantenimiento de cultivos celulares.

Los resultados de IDD parecen indicar ciertas diferencias, cuando se compara el total de positivos con los que presentan lí-

nea doble. En la figura 4 se podría indicar un cierto retraso de la curva de positividad con línea doble con respecto a la del total de positivos, si bien los límites de confianza de ambas curvas no permiten afirmar que dicho retraso sea real, debido al bajo número de sueros que comprende cada grupo de edad. Si se comprobara este retraso, podría explicarse por dos causas: 1) Que la segunda línea corresponda a un componente del mismo tipo de virus menos antigénico o que se detecte con mayor dificultad, o bien ambos y 2) que la línea adicional encontrada en algunos sueros fuera específica de tipo y, dado que la curva resultante al representar el porcentaje de sueros que muestran esta línea en cada grupo de edad parece sufrir un retraso con respecto a la obtenida según el total de positivos, esta línea sería específica de tipo 2, y se la habría detectado por reacción cruzada con el antígeno de tipo 1, al no ser este específico.

Todos los sueros investigados y con resultado positivo en IDD, mostraron una línea de precipitación común. Se trató de

comprobar si esta podría corresponder a la línea denominada anti-Banda II, descrita por Skinner *et al.*, en 1974, como común a todos los sueros humanos que reaccionan en IDD con preparaciones de ambos tipos de *Herpes simplex*. Con ese propósito se ensayaron 50 de los sueros positivos, en forma paralela con un antisuero anti-Banda II. En todos los casos, se obtuvo reacción de identidad entre la línea obtenida con el antisuero y las de los sueros ensayados; por tanto, se puede concluir que esta línea común corresponde a anticuerpos anti-Banda II.

Los resultados obtenidos por fijación de complemento refuerzan claramente las curvas obtenidas por NT e IDD. La primoinfección por VHS parece ocurrir de modo preferente entre el primero y el quinto año de vida, ya que es en estos grupos de edad donde se registra un rápido aumento en los porcentajes de positividad obtenidos por las tres técnicas. Después de una ligera caída, la positividad en FC vuelve a ascender, a partir de los 20 a 25 años de edad, para acabar estabilizándose en un valor aproximado al 50% de positividad, a partir de los 30 años de edad. Este comportamiento de la curva de FC es muy congruente con el hecho de que las curvas de NT e IDD nunca alcanzan una estabilidad, sino que se mantienen en permanente ascenso, aunque este sea muy ligero a partir de los 5 a 10 años de edad. Sobre el significado de este segundo ascenso que registra la curva de FC, podrían formularse dos hipótesis:

1) La primoinfección por *Herpes simplex* se produce con preferencia en los cinco primeros años de vida, para disminuir luego y reforzarse en edades más avanzadas por efecto de las recurrencias que, en ciertos casos, dan lugar a una reaparición de los anticuerpos fijadores de complemento, y

2) La prolongación del segundo tramo de ascenso que aparece en la curva de FC corta el eje de abscisas en un punto que corresponde a los 10 a 12 años. Esto podría indicar que a partir de dicha edad comienza a detectarse la infección

por tipo 2, de modo que la curva obtenida sea el resultado de la suma de dos curvas, cada una de las cuales corresponde a anticuerpos frente a uno de los dos tipos de virus. Así pues, durante los 10 a 12 primeros años de vida, se detectaría la curva correspondiente a la circulación del VHS-1, y a partir de esta edad se comenzaría a registrar de forma aditiva, la circulación del VHS-2. Esta hipótesis parece coincidir con los datos sobre encuestas realizadas en población normal por cinética de neutralización (9-10). Según tales encuestas, los anticuerpos neutralizantes específicos de tipo 2 comienzan a aparecer desde los 13 años de edad, y alcanzan hasta el 20% de positividad en edades superiores a los 20 a 25 años.

La diferenciación entre anticuerpos frente a VHS-1 y VHS-2 en sueros humanos es un tema que ha despertado gran interés en todo el mundo, debido a la posible relación del VHS-2 con el cáncer de cérvix humano. Por tanto, sería muy importante contar con un método sencillo y rápido, capaz de realizar esta diferenciación.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran con claridad que la IDD es una técnica perfectamente aplicable a la detección de anticuerpos anti-VHS en sueros humanos, con un nivel de precisión comparable al de la prueba de neutralización. La aplicación de la IDD, mejorada en términos de precisión, podría servir para identificar alguno de los polipéptidos descritos como portadores de especificidad de tipo total o parcial, como el VP19e (11) o los VP7/8. Este hecho permitiría aplicar la técnica de IDD para la detección de anticuerpos tipo específicos, con las correspondientes ventajas en cuanto a sencillez y rapidez.

Resumen

En la actualidad, la microneutralización es una técnica muy utilizada en la realización de estudios seroepidemiológicos de virus *Herpes simplex*. También la fijación de complemento se utiliza con regularidad en

el diagnóstico de las infecciones recientes debidas a estos virus.

En el presente trabajo se han analizado un total de 512 sueros, clasificados en 12 grupos, según edad. Para ello se utilizaron las dos técnicas mencionadas (Grist, 1974) y la de inmunodifusión doble (modificación de la descrita por Skinner, 1974). La comparación de los porcentajes de positividad por grupos de edades, obtenidos por microneutralización e inmunodifusión doble, revela una gran similitud de resultados entre ambas técnicas. Tales resultados son coherentes con los obtenidos por fijación de complemento, e indican que la inmunodifusión doble presenta un nivel de precisión muy similar al de la microneutralización y que se trataría de una técnica válida

para estudios seroepidemiológicos de virus *Herpes simplex*, así como para el diagnóstico de las infecciones producidas por ellos; al mismo tiempo ofrece la ventaja de una gran sencillez en su realización y rapidez en la obtención de resultados. En el artículo se discute la posibilidad del empleo de la inmunodifusión doble en la determinación de anticuerpos específicos de tipo. □

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento a F. de Ory Manchón, P. Anda Fernández, M. P. Marcos Moreno y M. D. García Rodríguez, por su colaboración en la realización de las pruebas serológicas, y a A. Llácer Gil de Rámales por su colaboración en el tratamiento estadístico de los resultados.

REFERENCIAS

- (1) Skinner, R. B. G., J. Taylor y J. Edward. Precipitating antibodies to *Herpes simplex* virus in human sera: Prevalence of antibody to common antigen (Band II). *Intervirology* 4:320-324, 1974.
- (2) Watson, D. H., W. I. H. Shedden, A. Elliot, T. Tetsuka, P. Wildy, D. Bourgaux-Ramoisy y E. Gold. Virus-specific antigens in mammalian cells infected with *Herpes simplex* virus. *Immunology* 11:399-408, 1966.
- (3) Watson, D. H. y P. Wildy. The preparations of "monoprecipitin" antisera to herpes virus-specific antigens. *J Gen Virol* 4:165-168, 1969.
- (4) Watson, D. H. The separation of herpes virus-specific antigens by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Gen Virol* 4:152-161, 1969.
- (5) Sever, J. L. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J Immunol* 88:320-329, 1952.
- (6) Kalter, S. S. Microculture procedures. En *Tissue Culture: Methods and Applications*. Academic Press, 1973.
- (7) Grist, N. R., C. A. Ross y E. J. Bell. Diagnostic methods in clinical virology. 2ª edición. Osney Mead (Oxford): Blackwell Scientific Publications, 1974.
- (8) Bradstreet, C. M. P. y C. E. D. Taylor. Technique of complement fixation text applicable to the diagnosis of virus diseases. *Mon Bull Minist Health* 21:96, 1962.
- (9) Nahmias, A. J., W. E. Josy, D. M. Naib, C. F. Luce y A. Duffey. Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. I. Patients with genital herpetic infections. *Am J Epidemiol* 91:539-546, 1970.
- (10) Rawls, W. E., W. A. F. Tompkins y J. L. Melnick. The association of herpesvirus type 2 and carcinoma of the uterine cervix. *Am J Epidemiol* 89:547-554, 1969.
- (11) Jones, R. W y D. H. Watson. *Herpes simplex* virus-specific polypeptides studied by polyacrylamide gel electrophoresis of immune precipitates. *J Gen Virol* 22:171-185, 1974.

Double immunodiffusion in seroepidemiologic studies of *Herpes simplex* viruses (Summary)

At present, neutralization is a technique used frequently in making seroepidemiologic studies of *Herpes simplex* viruses. Complement fixation is also used often in the diagnosis of recent infections due to these viruses.

In this study a total of 512 sera classified in 12 age groups were analyzed. Both of the above mentioned techniques were used (Grist, 1974), as well as immunodiffusion (a modification of the technique described by Skinner, 1974). Comparison of positivity percentages by age groups, obtained from microneutralization and from double immunodiffusion, show great

similarity. These results are in line with those obtained by complement fixation and indicate that double immunodiffusion affords a precision level similar to that of microneutralization. They also show that it would be a valid technique for seroepidemiologic studies of *Herpes simplex* viruses, as well as for diagnosis of the infections they produce. At the same time double immunodiffusion has the advantage of being a simple technique that gives results rapidly. In the article the possibilities of using double immunodiffusion in the determination of specific type antibodies is discussed.

A imunodifusão dupla em estudos de seroepidemiologia dos vírus *Herpes simplex* (Resumo)

Atualmente a microneutralização é uma técnica utilizada amplamente nos estudos seroepidemiológicos do vírus *Herpes simplex* e, igualmente, a fixação do complemento é utilizada regularmente no diagnóstico de infecções recentes causadas por esses vírus.

Este trabalho analisa 512 soros em total, classificados em 12 grupos, de acordo com a idade. Utilizaram-se as técnicas mencionadas (Grist, 1974) e a de imunodifusão dupla (modificação da técnica descrita por Skinner, 1974). A comparação das percentagens de positividade por grupos de idades, obtidos por microneutralização e imunodifusão dupla mostra uma grande semelhança de resultados

entre as duas técnicas que são congruentes com os resultados obtidos por meio da fixação do complemento. Esses resultados indicam que a imunodifusão dupla apresenta um nível de precisão muito similar ao da microneutralização e seria uma técnica válida para estudos seroepidemiológicos de vírus *Herpes simplex*, bem como para o diagnóstico das infecções causadas por esses vírus, ao mesmo tempo que tem a vantagem de ser de uma grande simplicidade tanto em realização como em rapidez para a obtenção de resultados. Por outro lado, discute-se a possibilidade de empregá-la para a determinação de anticorpos específicos de tipo.

La double immunodiffusion dans les études séroépidémiologiques des virus *Herpes simplex* (Résumé)

La microneutralisation est une technique largement utilisée, actuellement, au cours des études séroépidémiologiques des virus *Herpes simplex*. De même, la fixation du complément est régulièrement utilisée pour le diagnostic des infections récentes provoquées par ces mêmes virus.

Aucours de ce travail, 512 sérums ont été analysés, séparés en douze groupes en fonction de l'âge. Les techniques utilisées ont été celles que nous venons de mentionner (Grist, 1974) et la double immunodiffusion (modifiée par Skinner, 1974). Les pourcentages de résultats positifs dans les différents groupes, obtenus

par microneutralisation, sont comparables à ceux de la double immunodiffusion. Les résultats de ces deux techniques sont à leur tour compatibles avec ceux de fixation du complément. La double immunodiffusion possède donc un degré de sensibilité équivalent à celui de la microneutralisation; il en résulte une technique utilisable pour les études séroépidémiologiques des virus *Herpes simplex*, ainsi que pour le diagnostic des infections dont ils sont responsables. Cette technique présente de plus l'avantage d'être simple et rapide. Par ailleurs, il est envisagé de l'employer pour la détermination d'anticorps spécifiques de type.