

Virus del herpes simplex tipo 1: un posible agente de transmisión sexual en población universitaria

Enrique Corona-Oregón,^a Carlos Jesús Conde-González,^b Blanca Lilia Barrón^c
y Miguel Ángel Sánchez-Alemán^{b*}

^aFacultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

^bCentro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México

^cEscuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

Recibido en su versión modificada: 29 de enero de 2010

Aceptado: 12 de febrero de 2010

RESUMEN

Objetivo: Estudiar los factores asociados a la presencia de anticuerpos contra el virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1), así como identificar éste en muestras genitales.

Métodos: Los estudiantes universitarios contestaron un cuestionario y proporcionaron muestras biológicas (sangre y exudado genital). La detección de anticuerpos clase IgG e IgM contra HSV-1 se realizó mediante ELISA. A partir de las muestras positivas a IgM se buscó su muestra genital, se extrajo ADN y se identificaron betaglobina humana así como HSV-1.

Resultados: Participaron 815 estudiantes, la seroprevalencia de IgG-HSV-1 fue de 56.7%; la infección se asoció con el número de parejas sexuales, intercambiar sexo por dinero, relaciones con personas del mismo sexo y parejas ocasionales. La seroprevalencia de IgM-HSV-1 fue de 18.2%; a partir de estas muestras se buscó infección genital por HSV-1; 91 muestras fueron positivas a betaglobina pero en ninguna se detectó HSV-1.

Conclusiones: Los datos epidemiológicos sugieren que el HSV-1 puede ser una infección de transmisión sexual en la población universitaria analizada, sin embargo, en ninguno de los individuos se corroboró presencia genital del HSV-1. Es necesario estudiar esta infección en otras poblaciones susceptibles o incrementar el tamaño de la muestra.

Palabras clave:

Virus del herpes simplex, infecciones de transmisión sexual, universitarios

SUMMARY

Objective: To study the factors associated with the presence of antibodies against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and to screen for HSV-1 in genital samples.

Materials and methods: Students answered a survey and provided biological samples (blood and genital discharge). The detection of IgG and IgM antibodies against HSV-1 was performed by an ELISA test. From IgM positive samples we sought and extracted genital DNA and identified a beta-globulin gene and HSV-1.

Results: Eight hundred and fifteen students participated. IgG/HSV-1 seroprevalence was 56.7%, HSV-1 infection was associated with number of sexual partners, exchanging sex for money, same sex relationships and occasional partners. IgM/HSV-1 seroprevalence was 18.2%, 91 samples were positive for human beta-globulin but none for HSV-1 DNA.

Conclusions: Epidemiological evidence suggests that HSV-1 could be transmitted by sexual contact among college students; however, HSV-1 was not detected in any of the genital samples analyzed. To further test our hypothesis we need to study HSV-1 among high risk groups or increase our sample size.

Key words:

Sexually transmitted infections, university students, herpes simplex virus

Introducción

Los virus del herpes simplex tipo 1 y tipo 2 (HSV-1/HSV-2) ocasionan infecciones que se encuentran distribuidas en todo el mundo. El HSV-1 origina principalmente herpes orolabial (lesiones ulcerativas, dolorosas y recurrentes) y la infección se asocia con factores demográficos como edad, nivel socioeconómico (condiciones de hacinamiento,

sanidad y bajos ingresos) y determinadas zonas geográficas (países en desarrollo). En contraste, el HSV-2 es el principal agente del herpes genital y facilita la adquisición del virus de inmunodeficiencia humana (HIV).^{1,2} Sin embargo, el HSV-1 como causa de herpes genital en países desarrollados está en aumento: el aislamiento genital del virus se incrementó en Estados Unidos, Reino Unido, Noruega, Escocia y Australia;³⁻⁷ incluso es el principal agente de herpes genital entre

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Miguel Ángel Sánchez-Alemán. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatlán, 62508 Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: msanchez@insp.mx

universitarios de Estados Unidos, pacientes de una clínica genitourinaria de Reino Unido y mujeres de una clínica de infecciones de transmisión sexual en Suecia.^{3,4,8}

El aumento del HSV-1 como agente del herpes genital tiene al menos tres causas probables: la disminución de la prevalencia de herpes oral, cambios en el comportamiento sexual oral-genital y la existencia de cepas más virulentas o mejor adaptadas a la mucosa genital.⁹ En países desarrollados como Islandia, Japón y Reino Unido, la infección por HSV-1 ha disminuido durante la niñez a través del tiempo,^{2,10,11} lo que origina poblaciones susceptibles de adquirir al virus por vía sexual; en cambio, en países en desarrollo la seroprevalencia de HSV-1 en adolescentes varía entre 74.3 y 94.9 %, ^{12,13} con poblaciones poco susceptibles a adquirir la infección genital. Los estudios del HSV-1 como agente de infecciones de transmisión sexual se han llevado a cabo principalmente en países desarrollados, sin embargo, el virus también puede originar herpes genital en países en desarrollo.

En México existe un informe de siete aislamientos clínicos de herpes genital que al ser tipificados en dos de ellos se identificó al HSV-1 como agente causal.¹⁴ El objetivo del presente análisis fue estudiar al HSV-1 como agente de transmisión sexual en una muestra de estudiantes universitarios. Se determinó la seroprevalencia de HSV-1, así como los factores demográficos y de comportamiento sexual asociados con la infección, además de buscar HSV-1 en muestras genitales.

Material y métodos

Trabajo de campo

En la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, entre 2002 y 2005 se desarrolló el proyecto de investigación. Los estudiantes firmaron una carta de consentimiento informado, contestaron un cuestionario autoaplicado sobre características demográficas y de comportamiento sexual y proporcionaron muestras biológicas, una de sangre y una genital por autotoma.

La muestra sanguínea se centrifugó, se separó el suero, se alicuotó y mantuvo a -20°C hasta su procesamiento. La muestra genital se agitó de manera vigorosa durante un minuto, posteriormente se retiró el hisopo con el que se tomó la muestra, se alicuotó y se mantuvo a -20°C hasta su procesamiento.

Análisis de laboratorio

A partir de la muestra de sangre se realizaron dos pruebas de ELISA (EUROIMMUN-Alemania): la primera para la detección de anticuerpos clase IgG específicos contra el HSV-1 (que indican infección por el virus, ya que éste queda latente durante toda la vida) y la segunda para la detección de anticuerpos clase IgM específicos contra el HSV-1, como un marcador proximal de diseminación viral, oral o genital. A partir de las muestras serológicas positivas a IgM se buscó

su correspondiente muestra genital, a la que se le realizó extracción de ADN por medio de un estuche comercial de columnas de intercambio iónico (QIAamp DNA mini kit, Qiagen-EUA). A partir de esta extracción se realizaron dos reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa); la primera PCR identificó un fragmento del gen de betaglobina humana¹⁵ por medio de los iniciadores GH20 (GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC) y PC04 (CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC), con las siguientes concentraciones de reactivos: amortiguador de reacción 1X, MgCl_2 2 mM, dNTP 0.2 mM, Amplitaq 0.06 U, iniciadores 0.015 μM (c/u) y 5 μl de la muestra en un volumen final de 25 μl . Una temperatura de activación de 95°C por cinco minutos, posteriormente 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; finalmente, una extensión de 72°C por siete minutos.

El fragmento amplificado tiene una longitud de 268 pb y como control positivo se emplearon células Caski. La beta globina humana se determinó como un control de calidad de una correcta toma de muestra, de una eficiente extracción de ácidos nucleicos y de que el ADN estaba en condiciones de amplificación. La segunda PCR buscó identificar HSV-1 o HSV-2. Se utilizaron tres iniciadores, uno común para ambos tipos de HSV y dos específicos, para HSV-1 y HSV-2.¹⁶ HSV: ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG (común), HSV-1: CCT CGT GTT CGT CCT CGT CCT CC y HSV-2: CCT CCT TGT CGA GGC CCC GAA AC, con las siguientes concentraciones de reactivos: amortiguador de reacción 1 X, MgCl_2 1.5 M, dNTP 0.08 mM, Amplitaq 0.04 U/ μl , iniciadores 0.015 μM (c/u) y 5 μl de la muestra en un volumen final de 25 μl . Una temperatura de activación de 94°C por dos minutos, posteriormente 45 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, finalmente una extensión de 72°C por siete minutos. Para HSV-1 se amplificó un fragmento de 469 pb y para HSV-2 de 391 pb. Para esta amplificación se utilizaron como controles positivos la cepa MacIntyre de HSV-1 y la cepa G de HSV-2.¹⁴

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de asociación con anticuerpos clase IgG contra HSV-1 como variable resultado, y como variables de exposición las diversas características demográficas y de comportamiento sexual. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15.0, con intervalos de confianza a 95 %. La comparación entre las variables se hizo con χ^2 . En este trabajo se consideraron las variables con una $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativas.

Resultados

Participaron 815 estudiantes, 529 mujeres y 286 hombres, el promedio de edad de la población fue de 21.7 años (IC 95 % = 21.4-21.9), 91 % eran solteros y 76.6 % había iniciado su vida sexual. Los hombres comenzaron su vida sexual a los 16.9 años (IC 95 % = 16.6-17.2) y las mujeres a los 18.4 años (IC 95 % = 18.2-18.6), los varones iniciaron con parejas de 18.6 años (IC 95 % = 18.2-19.1) y las mujeres

debutaron con parejas de 21.2 años (IC 95 % = 20.8-21.7). La seroprevalencia de anticuerpos IgG contra HSV-1 fue de 56.7 % (IC 95 % = 53.3-60.1), la mayor seroprevalencia de HSV-1 se asoció con mayor edad y menor índice de bienes. El 60 % de los estudiantes sexualmente activos presentó anticuerpos IgG contra HSV-1, en contraste con 45.5 % de los sexualmente inactivos que tenían anticuerpos. Haber tenido tres o más parejas, el intercambio de sexo por dinero, las relaciones con personas del mismo sexo y tener parejas ocasionales, representaron los factores asociados con mayor seroprevalencia de HSV-1 (66.2, 90.9, 75.7 y 69.8 %, respectivamente), como lo muestra el cuadro I, en el que se describen

Cuadro I. Anticuerpos IgG contra HSV-1 entre estudiantes universitarios, y su asociación con características demográficas y de comportamiento sexual

	n	HSV-1 (%)	p
Sexo			
Mujer	529	58.0	0.291
Hombre	286	54.2	
Edad			
≥ 26	59	72.9	0.001*
21-25	412	59.7	
18-20	335	50.1	
Bienes			
Bajo	228	68.4	<0.001*
Medio	263	58.9	
Alto	322	46.6	
Actividad sexual			
Sí	624	60.1	< 0.001*
No	191	45.5	
Sexo oral			
Sí	414	60.6	0.002*
No	210	59.0	
Inactivos	191	45.5	
Condón			
No	254	63.4	0.001*
Sí	370	57.8	
Inactivos	191	45.5	
Parejas sexuales			
3-más	198	66.2	< 0.001*
1-3	426	57.3	
Inactivos	191	45.5	
Sexo por dinero			
Sí	11	90.9	< 0.001*
No	613	59.5	
Inactivos	191	45.5	
Personas del mismo sexo			
Sí	37	75.7	< 0.001*
No	587	59.1	
Inactivos	191	45.5	
Parejas ocasionales			
Sí	129	69.8	< 0.001*
No	495	57.6	
Inactivos	191	45.5	

*Estadísticamente significativos.

las características demográficas y de comportamiento sexual asociadas con anticuerpos IgG de HSV-1.

Para orientar sobre la posible presencia de ADN de HSV-1 en genitales, se identificaron anticuerpos clase IgM, los cuales se encuentran en infecciones recientes o durante las reactivaciones, por lo que la presencia de IgM podría ser un marcador indirecto de diseminación viral. Se procesaron 815 muestras de suero, encontrando 148 positivas a anticuerpos clase IgM contra HSV-1, lo que muestra una seroprevalencia de 18.2 % (IC 95 % = 15.5-20.8). A partir de estas 148 muestras seropositivas a IgM se buscó su correspondiente muestra genital, se procesaron 113 muestras genitales; las 35 restantes fueron de estudiantes que no proporcionaron este tipo de muestra. La figura 1 muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el que se muestra una PCR de betaglobina; de las 113 muestras genitales, 91 fueron positivas al gen de globina (80.5 %), lo que asegura la buena calidad de esas muestras genitales. A partir de las muestras positivas a betaglobina, se realizó PCR para identificar HSV-1, tal como se muestra en la figura 2, en la que se observan los controles positivos de HSV-1 y HSV-2; en ninguna de las muestras procesadas se detectó ADN de HSV-1.

Discusión

En los estudiantes universitarios mexicanos analizados se identificó 56.7 % con anticuerpos clase IgG contra HSV-1, menor a lo señalado en países en desarrollo (Brasil, Estonia, India, Marruecos, Sri Lanka, República Checa, Bulgaria y

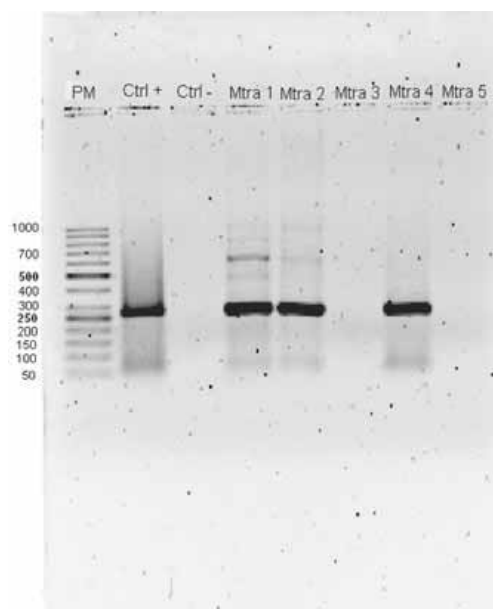


Figura 1. Productos de PCR para detección de betaglobina. PM = marcador de peso molecular; Ctrl+ control positivo, Ctrl- control negativo, Mtra 1, 2 y 4 = muestras positivas a betaglobina, Mtra 3 y 5 = muestras negativas a betaglobina.

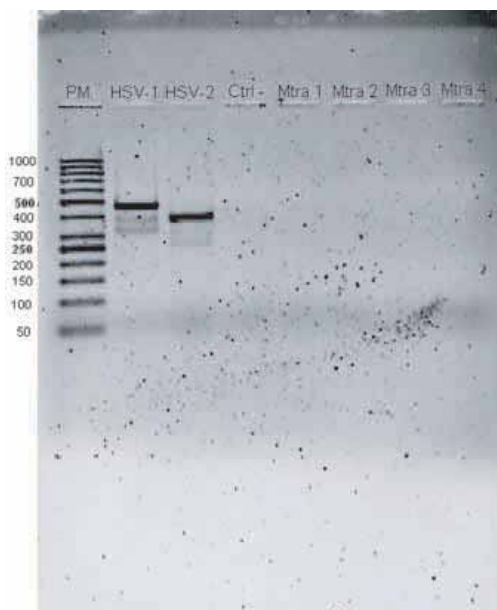


Figura 2. Productos de PCR para detección de HSV-1 y HSV-2. PM = marcador de peso molecular, HSV-1 = control positivo para HSV-1, HSV-2 = control positivo para HSV-2, CrtI- control negativo, Mtra 1, 2, 3 y 4 = muestras negativas a HSV-1 y HSV-2.

Eslovenia), en los que la seroprevalencia varía de 79.2 a 92.1 %, ^{13,17} pero mayor a la encontrado en países desarrollados (Finlandia, Reino Unido y Japón), donde fue de 22 a 47 %, ^{17,18} todos comparados con un estrato similar de edad, 20 a 30 años.

Existen pocos informes serológicos sobre HSV-1 en universitarios y ninguno proviene de países en desarrollo. En España se encontró 55.3 %, en Alemania 48.9 % y en Estados Unidos entre 37.2 y 46.1 %. ^{19,20} Todos los registros similares a nuestros resultados.

La disminución de la infección por HSV-1 durante la niñez favorece la transmisión sexual del virus, esto se debe a que los adultos seronegativos cuando inician su vida sexual son más susceptibles de adquirir HSV-1 genital. ^{8,11} La seroprevalencia de herpes (sin distinguir tipos virales) en la ciudad de México en 1970 fue de 81.5 % en población de 11 a 15 años, ²¹ mucho mayor a 56.7 % registrada en los universitarios del presente estudio. No es posible asegurar que la seroprevalencia ha disminuido a través del tiempo, pero numerosos estudiantes universitarios analizados fueron seronegativos, por lo que pueden adquirir HSV-1 genital primario (población susceptible sin evidencia de anticuerpos). ²² Un caso muy diferente fue el de una muestra de mujeres trabajadoras sexuales de ciudad de México, que en 1992 presentaron una seroprevalencia de HSV-1 de 92.72 % en el intervalo de edad de 16 a 22 años. ²³ En ellas, el hacinamiento estuvo asociado a la infección pero no el comportamiento sexual, es decir, no eran susceptibles de adquirir la infección primaria ya que muy posiblemente la habían adquirido desde la niñez, sin embargo, es factible que

algunas mujeres pudieran desarrollar reinfección (infección por otra cepa de HSV-1). ²²

En la población universitaria analizada se encontraron factores demográficos asociados con infección por HSV-1 (edad y posesión de bienes), similar a lo señalado en muchos otros estudios en países en desarrollo, en los cuales la infección se adquiere durante la niñez y el herpes genital por HSV-1 es raro. ^{2,20,24} Por otra parte, también las variables de comportamiento sexual estuvieron relacionadas con la infección, tal como lo muestran Stock y colaboradores, quienes sugieren que la actividad sexual es importante para la transmisión de HSV-1 entre universitarios europeos (alemanes y españoles). ¹⁹ Estos autores registraron que los individuos que iniciaron su vida sexual tuvieron una mayor probabilidad de ser seropositivos a HSV-1, como lo encontrado en el presente trabajo. En nuestra población, las variables de comportamiento sexual se asociaron con infección por HSV-1, de manera similar a lo identificado entre universitarios de Estados Unidos, entre los cuales la seroprevalencia de HSV-1 se asoció con comportamientos sexuales (mayor tiempo de actividad sexual y menor edad de inicio de vida sexual). ²⁰

Los datos epidemiológicos sugieren que el HSV-1 puede transmitirse por vía sexual entre la población de estudiantes universitarios analizada, sin embargo, no se encontraron casos positivos al intentar identificar HSV-1 a partir de muestras genitales. La mayoría de los informes acerca de HSV-1 genital provienen de poblaciones asistentes a clínicas de infecciones de transmisión sexual o clínicas genitourinarias, ³⁻⁸ en las cuales los pacientes presentan ulceraciones y a partir de ellas se hace la detección y clasificación del virus herpes. En nuestro caso se partió de población abierta, que en general no referían ulceraciones genitales, por ese motivo se empleó como un marcador subrogado de diseminación viral la presencia de anticuerpos clase IgM, sin embargo, esta estrategia no logró la identificación positiva en ninguna muestra. A pesar de los resultados negativos, no se descarta la posibilidad de que el HSV-1 pueda generar infecciones de transmisión sexual entre la población analizada, en parte debido a la baja proporción de HSV-1 genital que puede estar presente, para lo cual se necesitaría ampliar el tamaño de la muestra o realizar investigaciones en poblaciones en las que la proporción de HSV-1 genital sea mayor, como los asistentes a clínicas genitourinarias o clínicas de infecciones de transmisión sexual, especialmente en pacientes con ulceraciones genitales.

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó con el financiamiento Salud-2004-C01-34 del Conacyt.

Referencias

1. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 2001;357:1513-1518.
2. Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis* 1990;69:19-36.

3. **Roberts CM, Pfister JR, Spear SJ.** Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* 2003;30:797-800.
4. **Thompson C.** Genital herpes simplex typing in genitourinary medicine:1995-1999. *Int J STD AIDS* 2000;11:501-502.
5. **Nilsen A, Myrmet H.** Changing trends in genital herpes simplex virus infection in Bergen, Norway. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79:693-696.
6. **Scoular A, Norrie J, Gillespie G, Mir N, Carman WF.** Longitudinal study of genital infection by herpes simplex virus type 1 in western Scotland over 15 years. *BMJ* 2002;324:1366-1367.
7. **Tran T, Druce JD, Catton MC, Kelly H, Birch CJ.** Changing epidemiology of genital herpes simplex virus infection in Melbourne, Australia, between 1980 and 2003. *Sex Transm Infect* 2004;80:277-279.
8. **Löwhagen G-B, Tunbäck P, Andersson K, Bergström T, Johannisson G.** First episodes of genital herpes in a Swedish STD population: a study of epidemiology and transmission by the use of herpes simplex virus (HSV) typing and specific serology. *Sex Transm Infect* 2000;76:179-182.
9. **Lafferty WE, Downey L, Celum C, Wald A.** Herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes: impact on surveillance and prevention. *J Infect Dis* 2000;181:1454-1457.
10. **Hashido M, Lee FK, Nahmias AJ, Tsugami H, Isomura S, Nagata Y, et al.** An epidemiological study of herpes simplex virus type 1 and 2 infection in Japan on type-specific serological assays. *Epidemiol Infect* 1998;120:170-186.
11. **Lamey P, Hyland PL.** Changing epidemiology of herpes simplex virus type 1 infections. *Herpes* 1999;6:20-24.
12. **Wagner H, Van Dyck E, Roggen, Nunn AJ, Kamali A, Schmid DS, et al.** Seroprevalence and Incidence of sexually transmitted diseases in rural Ugandan population. *Int J STD AIDS* 1994;5:332-337.
13. **Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, Artimos-de Oliveira S, et al.** Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. *Sex Transm Infect* 2003;79:286-290.
14. **Herrera-Martínez E, Ondarza-Aguilera R, Estrada-Parra S, Pérez G, Barrón BL.** Comparison of two methods of PCR followed by enzymatic restriction digestion for detection and typing of herpes simplex viruses isolated from patients with mucocutaneous or cutaneous lesions. *Rev Latinoam Microbiol* 2005;47:76-81.
15. **Bauer HM, Greer CE, Manos MM.** Determination of genital human papillomavirus infection using consensus PCR, p. 132-152. En: Herrington CS, McGee JOD, editors. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach.* Oxford, UK: Oxford University Press; 1992.
16. **Madhavan HN, Priya K, Bagyalakshmi R.** Phenotypic and genotypic methods for the detection of herpes simplex virus serotypes. *J Virol Methods* 2003;108:97-102.
17. **Pebody RG, Andrews N, Brown D, Gopal R, de Melker H, Francois G, et al.** The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sex Transm Infect* 2004;80:185-191.
18. **Hashido M, Kawana T, Matsunaga Y, Inouye S.** Changes in prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies from 1973 to 1993 in the rural district of Japan. *Microbiol Immunol* 1999;43:177-180.
19. **Stock Ch, Guillén-Grima F, Hermoso-de Mendoza J, Marín-Fernández B, Aguinaga-Ontoso I, Krämer A.** Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. *Eur J Epidemiol* 2001;17:885-890.
20. **Gibson JJ, Hornung CA, Alexander GR, Lee FK, Potts WA, Nahmias AJ.** A Cross-sectional study of herpes simplex virus types 1 and 2 in college students: occurrence and determinants of infection. *J Infect Dis* 1990;162:306-312.
21. **Gutiérrez G, Ruiz-Gómez J.** Seroepidemiology of 10 infectious diseases in children in Mexico City. Measles, rubella, parotitis, typhoid, whooping cough, amebiasis, influenza and adenovirus infections, *Mycoplasma pneumoniae* and herpes simplex. *Gac Med Mex* 1973;105:529-540.
22. **Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ.** The replication of Herpes simplex viruses. En: Knipe DM, Howley P, Griffin DE, editors. *Fields' virology.* Fifth edition. New York: Lippincott-Williams and Wilkins; 2007. pp. 2501-2601.
23. **Conde-Glez CJ, Juárez-Figueroa L, Uribe-Salas F, Hernández-Nevárez P, Schmid DS, Calderón E, Hernández-Ávila M.** Analysis of Herpes simplex virus 1 and 2 infection in women with high risk sexual behaviour in Mexico. *Int J Epidemiol* 1999;28:571-576.
24. **Smith JS, Robinson NJ.** Age-Specific Prevalence of Infection with Herpes Simplex Virus Types 2 and 1: A Global Review. *J Infect Dis* 2002;186(Suppl 1):S3-28.